

**USO DEL PROBIÓTICO *Shewanella putrefaciens* Pdp11
EN EL CULTIVO DE *Solea senegalensis*:
IMPLICACIONES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

SILVANA TERESA TAPIA PANIAGUA

TESIS DOCTORAL

2015




Ilustración: Cecilia Moreno

Directores:
Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez
Dra. María del Carmen Balebona Accino



Publicaciones y
Divulgación Científica

AUTOR: Silvana Teresa Tapia Paniagua
 <http://orcid.org/0000-0002-3656-5009>

EDITA: Publicaciones y Divulgación Científica. Universidad de Málaga



Esta obra está bajo una licencia de Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-SinObraDerivada 4.0 Internacional:

Cualquier parte de esta obra se puede reproducir sin autorización
pero con el reconocimiento y atribución de los autores.

No se puede hacer uso comercial de la obra y no se puede alterar, transformar o hacer
obras derivadas.

<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/legalcode>

Esta Tesis Doctoral está depositada en el Repositorio Institucional de la Universidad de
Málaga (RIUMA): riuma.uma.es



UNIVERSIDAD
DE MÁLAGA

FACULTAD DE CIENCIAS
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

**USO DEL PROBIÓTICO *Shewanella putrefaciens* Pdp11
EN EL CULTIVO DE *Solea senegalensis*:
IMPLICACIONES SOBRE LA MICROBIOTA INTESTINAL**

Memoria presentada por Dña. Silvana Teresa Tapia Paniagua para optar al grado de doctora.

Directores:

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Dra. María del Carmen Balebona Accino

Noviembre, 2015

FACULTAD DE CIENCIAS

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

D. JUAN JOSÉ BORREGO GARCÍA, Catedrático de Microbiología y Director del Departamento de Microbiología de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Málaga. INFORMA QUE: La Licenciada Dña. Silvana Teresa Tapia Paniagua ha realizado en los laboratorios de este Departamento el trabajo experimental conducente a la elaboración de la presente memoria de Tesis Doctoral.

Y para que así conste, expido el presente informe,

Noviembre, 2015

Fdo: Juan José Borrego García

Esta Tesis ha sido realizada en el Departamento de Microbiología de la Universidad de Málaga, bajo la dirección de sus directores, el Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez, Catedrático de Microbiología de la Universidad de Málaga, y la Dra. M^a Carmen Balebona Accino, Profesora Titular de Microbiología de la Universidad de Málaga, que dan su conformidad a la Memoria de la Tesis titulada: **“Uso del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en el cultivo de *Solea senegalensis*: implicaciones sobre la microbiota intestinal”** presentada por la Doctoranda Dña. Silvana Teresa Tapia Paniagua para optar al Título de Doctora.

Noviembre, 2015

Dr. Miguel Ángel Moriñigo Gutiérrez

Dra. María del Carmen Balebona

*A mi madre,
a Silvana, David y Eva*

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría salido a la luz sin la inestimable ayuda de de personas que de una u otra manera han participado en ella directa o indirectamente.

En primer lugar a mis directores Miguel Ángel Moriñigo y María del Carmen Balebona. Gracias por vuestro trabajo, por vuestro buen hacer, por la amabilidad, la paciencia y comprensión, por estar siempre ahí y hacer del laboratorio mi segunda casa. Estos agradecimientos son extensibles a Eduardo Martínez Manzanares, que hace ya casi 13 años que me llamó a su despacho para invitarme a formar parte de este maravilloso grupo y en el que espero me pueda quedar muchos más.

Gracias al resto de componentes del Departamento. A su director D. Juan José Borrego por permitirme realizar la tesis y al resto de profesores (Antonio de Vicente, Mari Carmen Alonso, Dolores Castro, Francisco Cazorla, Alejandro Pérez y Esther García Rosado), así como a Carmen Vila y María Muñoz, por la ayuda prestada en todo momento.

Mi agradecimiento también a la Dra. Inés García de la Banda y a la Dra. Carmen Lobo, ambas del Instituto Español de Oceanografía de Santander, por su colaboración, por su ayuda y por el trabajo mano a mano tan gratificante y enriquecedor que, pese a la distancia, no ha supuesto una barrera. Junto a ellas, gracias también a Dra. María José Prieto y al Dr. Juan Jurado, ambos de la Universidad de Córdoba. A la Dra. Mari Ángeles Esteban de la Universidad de Murcia que junto con su equipo se han llevado a cabo colaboraciones que han dado fruto publicaciones que tanto han enriquecido el trabajo.

Gracias en especial a mi grupo. A todas las personas que me he cruzado en estos años y con los que he compartido ratos maravillosos que han protagonizado momentos muy especiales. Gracias a mis “maestros”, ya doctores desde hace años, que me iniciaron en el mundo de la microbiología: la Dra. Mariana Chabrállón, la Dra. Patricia Díaz Rosales y el Dr. Salvador Arijo. A aquellos que coincidimos en los comienzos pero que hace unos años que ya alcanzaron sus metas (Dra. Rosa Rico y Dr. Pablo Rosas), como aquellos que decidieron tomar otros rumbos (especialmente a Juanma León Rubio, Lucía Narváez y Beatriz Gil), y a aquellos que todavía están inmersos en ella (en especial a Jose Alberto Núñez, Milena Fumanal, Alberto Medina y Jesús Moriñigo). A todos ellos gracias, puesto que no siempre ha sido fácil tenerme de compañera, ni aguantar mi ritmo de trabajo ni mis despistes y, sin embargo, siempre he obtenido de ellos una gran ayuda.

Gracias a mis amigas y compañeras de siempre que decidimos tomar el mismo camino y al acabar la carrera, nuestras vidas siguieron paralelas: Inmaculada de la Viuda, Diana Suarez Boomgard y Eli Tamayo. Gracias también los becarios de diversos departamentos por abrirme las puertas de vuestros laboratorios y conocimientos, en especial a los ya doctores Patricia Nobel, Braulio Gallardo, José Mariscal y Melissa Castillo del Departamento de Genética, así como a su técnico Pablo García por su incontable paciencia; al personal del Departamento de Biología Celular (especialmente a Jose Melu y a las niñas del grupo), al de Ecología y al de Bioquímica. En especial a los compañeros del laboratorio 1 y 2 tanto a las generaciones pasadas como a las presentes, por estar siempre dispuestos a echarnos una mano (Guti, Nuria, Claudia, David, María, Nacho, Benji, Alejandro, Estefanía, Dani, Patricia...).

Me gustaría dedicar un párrafo aparte para agradecer toda la ayuda prestada por mi gran compañera, amiga, entrenadora, técnica de ordenadores, niñera... y un largo etcétera sin la cual estos últimos años de la tesis no habrían sido lo mismo. Muchísimas gracias Sara Vidal por tu apoyo, ánimos, comprensión y sinceridad que tanta falta me ha hecho en muchos momentos y que me la hayas prestado de forma tan sincera y desinteresada. Espero que todo lo que te he podido enseñar te sirva para hacerte este camino no siempre fácil, algo más sencillo y lleno de éxitos allí donde vayas.

También al resto de amigos que sin pertenecer al ámbito científico han estado ahí y especialmente a Juanma y Natalia por esas “veladas” en las que también era partícipe mi ordenador y a Ceci Moreno, gran ilustradora, por la maravillosa portada que me ha diseñado.

No habría tesis suficiente para darle las gracias a mi familia. Especialmente a mis padres, porque de ellos he heredado las cualidades que me han capacitado llegar hasta aquí: la paciencia y capacidad de trabajo de mi padre y el esfuerzo y sacrificio de mi madre a la que especialmente la agradezco el haber conseguido que mis días “duren” más de 24 horas. Gracias por los ánimos y por haberlo hecho todo para que yo pudiera seguir con mi trabajo. Gracias también a mis hijos (Silvana, David y Eva), que han sabido entender que muchos días que su madre se quedaba en casa no era para jugar con ellos, otras muchas horas de más que he tenido que pasar fuera porque sabían que esto era también una pequeña parte de mi vida... y porque no han conocido otra madre que no fuera “predoctora”. Gracias a mi hermana Ada, a mi cuñado Antonio y mis sobrinos (Inmaculada y Antonio Sedeño) que del mismo modo siempre han estado dispuestos con su ayuda a hacerme el camino más fácil. Por último, pero no por ello menos importante, gracias a mi marido Agustín, por haberme introducido en el maravilloso mundo del Análisis de Componentes Principales y del análisis multivariante (y en el de la Astronomía, estadística, simuladores de vuelo, música, videojuegos, marketing, y ahora espero que no, en el de los Cerambícidos...), por haber aceptado al ordenador como un componente más del matrimonio, por tus valiosos aportes a mi trabajo, que siempre son de gran ayuda, y por tu paciencia en los cambios a última hora.

Muchas gracias a todos.

FINANCIACIÓN

Los ensayos que constituyen esta Tesis han sido subvencionados a través de diferentes proyectos de la Junta Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (AGL2005-07454-CO2-O2, AGL2008-05119-C02-02, AGL2010-20052, AGL2011-30381-C03-02) y la Junta de Andalucía (AGR-1842).

La Doctoranda ha sido becaria del plan de Formación de Profesorado Universitario (F.P.U.) del Ministerio de Educación, Cultura y Deporte durante el periodo 2008-2013.

PUBLICACIONES

Los resultados obtenidos a partir de los objetivos planteados en esta Tesis Doctoral han dado origen o son parte de las siguientes publicaciones científicas.

Objetivo 1

- Tapia-Paniagua ST, Díaz-Rosales P, García de la Banda I, Lobo C, Clavijo E, Balebona M.C, Moriñigo MA (2014). Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms. **Aquaculture**, 424:234–238.

- Tapia-Paniagua ST, Díaz-Rosales P, León-Rubio JM, García de La Banda I, Lobo C, Alarcón FJ, Chabrillón M, Mancera JM, Varela JL, Ruiz-Jarabo I, Arijo S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2012). Different effects of the use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Aquaculture International**, 20:1025-1039.

- Tapia-Paniagua ST, Chabrillón M, Díaz-Rosales P, García de la Banda I, Lobo C, Balebona MC, Moriñigo MA (2010). Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. **Microbial Ecology**, 60: 310-319.

Objetivo 2

- Tapia-Paniagua ST, Vidal S, Lobo C, García de la Banda I, Esteban, MA, Balebona MC, Moriñigo MA (2015). Dietary administration of the probiotic SpPdp11: changes produced in the intestinal microbiota and the expression of genes in the liver of farmed *Solea senegalensis* specimens treated with oxytetracycline. **Fish and Shellfish Immunology**, 46:449- 458.

- Tapia-Paniagua ST, Vidal S, Lobo, C, Prieto-Álamo MJ, Jurado J, Cordero H, Cerezuela R, García de la Banda, I, Esteban MA, Balebona MC, Moriñigo MA (2014). The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease. **Fish and Shellfish Immunology**, 41:209-221.

Objetivo 3

- Tapia-Paniagua ST*, Lobo C*, Moreno-Ventas X, García de la Banda I, Moriñigo MA, Balebona MC (2014). Probiotic supplementation influences the diversity of the intestinal microbiota during early stages of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). **Marine Biotechnology**, 16: 716-728.

- Lobo C*, Tapia-Paniagua ST*, Moreno-Ventas X, Alarcón FJ, Rodríguez C, Moriñigo MA, García de La Banda I (2014). Benefits of probiotic administration on growth and performance during ontogeny of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). **Aquaculture**, 433:183-195.

* Ambas autoras participaron por igual en el trabajo

Los resultados obtenidos han dado lugar a 20 comunicaciones, 11 de las cuales se han presentado en congresos internacionales y 9 nacionales (2 y 1, respectivamente, se presentaron como comunicaciones orales).

ABREVIATURAS

A₂₆₀	Absorbancia a 260 nm
A₂₈₀	Absorbancia a 280 nm
AB	Azul alcían
ACP	Análisis de Componentes Principales
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNasa	Desoxirribonucleasa
ADNc	ADN complementario,
ADNr 16S	ADN ribosómico 16S
ADNr 18S	ADN ribosómico 18S
ARDRA	Análisis de restricción del ADN ribosomal amplificado (<i>Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis</i>)
ARN	Ácido ribonucleico
ARNasa	Ribonucleasa
ARA	Ácido araquidónico, 20:4n-6
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	ARN mensajero
ATCC	Colección Americana de Cultivos Tipo (<i>American Type Culture Collection</i>)
BLAST	<i>Basic Local Alingment Search</i>
Ct	Ciclo umbral (<i>threshold cycle</i>)
DEPC	Dietil pirocarbonato
DGGE	Electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (<i>Denaturing Gradient Gel Electrophoresis</i>)
DHA	Ácido docosahexanoico, 22:6n-3
DHGLA	Di-homogammalinolenico, 20:3n-6
dNTP	Desoxirribonucleótido trifosfato
dpe	Después de la eclosión
dpi	Puntos por pulgada (<i>dots per inch</i>)
E	Eficiencia
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético (<i>Ethylenediaminetetraacetic Acid</i>)
EFA	Ácidos grasos esenciales (<i>Essencial Fatty Acid</i>)
EPA	Ácido eicosapentanoico, 20:5n-3
F1	Factor 1
F2	Factor 2
F	Directa (<i>Forward</i>)
FAO	<i>Food and Agriculture Organization of the United Nations</i>
FISH	Hibridación <i>in situ</i> con fluorescencia (<i>Fluorescent in situ hybridization</i>)

FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GALT	Tejido linfoide asociado al intestino (<i>Gut Associated Lymphoid Tissue</i>)
H'	Índice de diversidad de Shannon
HE	Hematoxilina-Eosina
HUFA	Ácidos grasos altamente insaturados (<i>Highly Unsaturated Fatty Acid</i>)
IEO	Instituto Español de Oceanografía
IL	Inclusiones lipídicas
JACUMAR	Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos
LCDV	Virus de la Linfocistis (<i>Lymphocystis Disease Virus</i>)
LMR	Máximo de Residuo Establecido
LPS	Lipopolisacáridos (<i>Lipopolysaccharide</i>)
MOS	Manano oligosacáridos
MUFA	Ácido graso monoinsaturado (<i>Monounsaturated Fatty Acid</i>)
n-3, n-6	Ácidos grasos de la series 3, 6
NCBI	Centron Nacional para la Información Biotecnológica (<i>National Center for Biotechnology Information</i>)
OMS	Organización Mundial de la Salud
OTC	Oxitetraciclina
OTUs	Unidades Taxonómicas Operativas (<i>Operative Taxonomic Units</i>)
PAS	Tinción con ácido peyódico de Schiff
pb	Pares de bases
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PGs	Prostaglandinas
PHB	Poly β -hidroxibutirato
ppm	Partes por millón
PUFA	Ácido graso poliinsaturado (<i>Polyunsaturated Fatty Acid</i>)
Rv	Inversa (<i>Reverse</i>)
R	Riqueza de especies
RDP	<i>Ribosomal database project</i>
qPCR	PCR cuantitativa (<i>Quantitative Polimerase Chain Reaction</i>)
Rr	Habitabilidad
RAPDs	Amplificación aleatoria de ADN polimórfico (<i>Random Amplified Polymorphic DNA</i>)
RFLP	Polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (<i>Restriction Fragment Length Polymorphism</i>)
SEM	Error estándar de la media (<i>Standar Error of the Mean</i>)
SFA	Ácidos grasos saturados (<i>Saturated Fatty Acid</i>)

ROS	Especies reactivas de oxígeno (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SGR	Tasa de Crecimiento Específico (<i>Specific Growth Rate</i>)
SIMPER	Porcentaje de similitud (<i>Similarity Percentage</i>)
TAE	Tris-acético-EDTA (<i>Tris-Acetic EDTA</i>)
TBE	Tris-borato-EDTA (<i>Tris-Borate EDTA</i>)
TESPA	3-aminopro-pil-trietoxi-silano
TRIS	Tris-hidroximetil-aminometano (<i>Tris-(hydroxymethyl aminomethane)</i>)
TSA	Agar tripticasa de soja (<i>Tryptone Soya Agar</i>)
TSB	Caldo tripticasa de soja (<i>Tryptone Soya Broth</i>)
U	Unidades de enzima
ufc	Unidades formadoras de colonias
UPGMA	<i>Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean</i>
UV	Ultravioleta (<i>Ultraviolet</i>)
VH	Altura media de las microvellosidades del intestino

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	27
1. La acuicultura	27
2. <i>Solea senegalensis</i> en la industria acuícola española	28
2.1. Importancia comercial y nutricional de <i>Solea senegalensis</i>	28
2.2. Cultivo de <i>Solea senegalensis</i> y problemas asociados	29
2.2.1. Estrés	34
2.2.2. Patologías de origen infeccioso	36
3. Probióticos en acuicultura	38
3.1. Mecanismos de actuación de los probióticos	43
3.2. Los probióticos en el cultivo de <i>Solea senegalensis</i>	44
4. Microbiota intestinal de los peces	45
4.1. Funciones de la microbiota intestinal de peces	46
4.1.1. Función metabólica	46
4.1.2. Funciones protectora y estructural	47
4.2. Estudio de la microbiota intestinal de los peces	49
2. HIPÓTESIS	55
3. OBJETIVOS	59
4. MATERIAL Y MÉTODOS	63
1. Microorganismos probióticos	63
2. Preparación de las dietas experimentales	65
2.1. Preparación e incorporación del probiótico en el pienso	65
2.2. Bioencapsulación de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 en <i>Artemia</i> para la alimentación larvaria	65
3. Análisis de la microbiota intestinal	66
3.1. Extracción de ADN y realización de PCR	66

3.2. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)	68
3.2.1. Análisis de los patrones de DGGE	68
3.3. Secuenciación de bandas obtenidas en la DGGE	69
3.4. Clonación de productos de PCR	69
3.5. Análisis de secuencias	70
4. Estudio histológico	71
5. Estudio de transcripción de genes de <i>Solea senegalensis</i>	71
5.1. Cuantificación relativa de transcritos por PCR a tiempo real (qPCR)	71
5.1.1. Extracción de ARN y obtención del ADNc	71
5.1.2. Elección de genes de referencia	72
5.1.3. Realización de PCR a tiempo real qPCR	74
5.1.4. Tratamiento de los datos	74
5.2. Cuantificación absoluta de transcritos por qPCR	76
5.2.1. Extracción de ARN total y obtención de ADNc	76
5.2.2. Tratamiento de datos	76
6. Análisis de Componentes Principales	77
7. Diseños experimentales	79
7.1. Evaluación del efecto ejercido por <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	79
7.2. Evaluación de la forma de administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	80
7.3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	81
7.4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> sometidos a estrés	82
7.5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	84

7.6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	85
5. RESULTADOS	89
1. Evaluación del efecto ejercido por <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	89
1.1. Crecimiento de los ejemplares en cultivo	89
1.2. Composición de proteínas y ácidos grasos	89
1.3. Análisis de la microbiota intestinal	90
1.4. Estudio histológico de intestino e hígado	94
1.5. Análisis de componentes principales (ACP)	96
2. Evaluación de la forma de la administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	99
2.1. Análisis de la microbiota intestinal	99
3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	113
3.1. Análisis de la microbiota intestinal	113
3.2. Estudio de la expresión génica	118
3.3. Análisis de componentes principales (ACP)	120
4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> sometidos a estrés	122
4.1. Infección bacteriana	122
4.2. Análisis de la microbiota intestinal	123
4.3. Expresión génica en hígado de <i>Solea senegalensis</i>	131
4.4. Estudio histológico del intestino de <i>Solea senegalensis</i>	133
4.5. Análisis de componentes principales (ACP)	134
5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	136
5.1. Composición corporal	136

5.2. Análisis de la microbiota intestinal	136
5.3. Análisis de componentes principales (ACP)	139
6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	142
6.1. Análisis de la microbiota intestinal	142
6. DISCUSIÓN.....	151
1. Evaluación del efecto ejercido por <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	153
1.1. <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 ejerce un efecto difeencial sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	153
1.2. Los cambios inducidos por los probióticos en los lípidos hepáticos están relacionados con los cambios en la microbiota intestinal	154
2. Evaluación de la forma de la administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	156
2.1. La administración del probiótico liofilizado induce una menor diversidad en la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	157
2.2. <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 tiene capacidad de colonizar el intestino de los juveniles de <i>Solea senegalensis</i>	158
3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	159
3.1. <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 atenúa el efecto de la oxitetraciclina sobre la diversidad de la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	159
3.2. <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 con OTC incrementa la expresión de genes antiapoptóticos	160
4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de <i>Solea senegalensis</i> sometidos a estrés	164
4.1. La administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 redujo la mortalidad de <i>Solea senegalensis</i> afectados por patógenos <i>Vibrio harveyi</i> y <i>Vibrio parahaemolyticus</i>	164
4.2. El probiótico reduce la presencia de <i>Vibrio harveyi</i> en la microbiota intestinal de peces cultivados a alta densidad	165

4.3. La administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 modula cambios en la barrera intestinal de peces sometidos a estrés	166
5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	168
5.1. <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 coloniza el intestino y modula la microbiota intestinal de las larvas de <i>Solea senegalensis</i>	168
5.2. Los cambios inducidos por <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 en la microbiota intestinal de las larvas de <i>Solea senegalensis</i> están relacionados con la proporción DHA/EPA y el crecimiento larvario	169
6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 bioencapsulado en <i>Artemia</i> sobre la microbiota intestinal de <i>Solea senegalensis</i>	170
6.1. Tiempos cortos de aplicación del probiótico <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 también modulan la microbiota intestinal	170
6.2. La administración de <i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 reduce la presencia de <i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i> en la microbiota de larvas	172
7. CONCLUSIONES	177
8. BIBLIOGRAFÍA	181
ANEXOS	233

1 INTRODUCCIÓN

“El comienzo es la parte más importante de la obra”

Platón

1. INTRODUCCIÓN

1. La acuicultura

La acuicultura se define como el conjunto de actividades, técnicas y conocimientos que se aplican para la producción de organismos acuáticos incluyendo peces, moluscos, crustáceos y plantas (FAO, *Food and Agriculture Organization of the United Nations*, 1992).

Los resultados más recientes publicados por la Asociación Empresarial de Productores de Cultivos Marinos de España (APROMAR, 2015) afirman que la acuicultura mundial puso en el mercado 97,2 millones de toneladas (t) de productos acuáticos en 2013, frente a los 93,8 millones procedentes de capturas. Si además se considera que 21 millones de toneladas obtenidas de la pesca no van destinadas al consumo humano, la acuicultura ya provee más alimento para el consumo humano que la pesca.

España es un país con una importante tradición pesquera y con unos hábitos importantes de consumo de pescado. Estos hechos empujaron hace ya 30 años al desarrollo de empresas dedicadas a la acuicultura continental y marina, ésta última basándose en el cultivo de la dorada (*Sparus aurata*), lubina (*Dicentrarchus labrax*) y rodaballo (*Psetta maxima*), principalmente. Hoy en día la acuicultura moderna se considera una alternativa eficaz, basada en la innovación, el conocimiento científico y con la experiencia práctica acumulada con los años. Con 223.709 t en 2013 (17,5% del total de la UE) (APROMAR, 2015), España es uno de los estados miembro de la Unión Europea (UE) con mayor volumen de producción acuícola.

Entre las especies piscícolas marinas que más contribuyen a la producción de la acuicultura en España se encuentran la dorada y la lubina; sin embargo, desde el año 2011, la caída en la producción piscícola marina total se dio de forma generalizada, hasta conseguir un incremento en 2013, que se consolidó en 2014 (Tabla 1). Con el fin de seguir mejorando tanto la producción como la rentabilidad de los cultivos, se está invirtiendo en la optimización de la tecnología empleada en el desarrollo y mantenimiento de los individuos (Fletcher y Rise, 2012; Meaden y Aguilar-Manjarrez, 2013; Xingyi y col., 2010), así como en los sistemas de alimentación (Hamre y col., 2013; Trushenski y col., 2013) (APROMAR, 2015). Entre estas mejoras, se ha planteado una disminución de la dependencia de la harina y aceite de pescado, así como la introducción de elementos que faciliten el mantenimiento de un buen estado nutricional y fisiológico de los organismos (Gamboa-Delgado y col., 2011); la selección de individuos más adaptados a las condiciones de cultivo (Hamre y col., 2013; Somerset y Saillant, 2014; Stevens y col., 2014), al estrés y a las enfermedades (Cerdeira y Manchado, 2013; Louro y col., 2014); o la diversificación de especies (Allsopp y col., 2011; Fotodar y Phillips., 2011). Éste es el caso del lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) con el que, tras muchos esfuerzos y años de investigación y desarrollo, se han logrado grandes expectativas comerciales.

Tabla 1. Evolución de la producción de las principales especies de crianza en la acuicultura marina de España (en Toneladas) durante el periodo 2007-2014 (APROMAR, 2015).

	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014
DORADA	22320	23930	23690	20360	26930	19430	16795	16230
LUBINA	10480	9840	13840	12495	14367	14270	14707	17376
RODABALLO	6080	7870	8320	6910	7755	7970	6814	7808
ATÚN ROJO	7500	8400	8000	7200	5426	5426	6927	SD
CORVINA	810	1300	1660	3250	2880	1640	89	1090
ANGUILA	360	470	510	446	505	460	315	366
BESUGO	194	200	185	185	200	187	228	172
LENGUADO	60	55	188	204	110	194	343	787
TOTAL MARINOS	47844	52065	56393	51050	58173	49577	46218	43829*

SD: sin datos. * No están incluidos los datos de producción del atún rojo.

2. *Solea senegalensis* en la industria acuícola española

La acuicultura en España, centrada hasta los años 90 en unas pocas especies, comenzó a sufrir tanto una fuerte competencia por parte de países de nuestro entorno, como una saturación en el mercado de las especies disponibles. Gracias al apoyo de organismos como la Junta Nacional Asesora de Cultivos Marinos (JACUMAR), se comenzó a investigar la posibilidad de diversificar el cultivo con nuevas especies, naciendo así los Planes Nacionales de Cultivos Marinos. En el caso concreto de los peces planos, las de mayor interés comercial fueron el lenguado común (*Solea solea*) y el lenguado senegalés. A nivel empresarial se ha seleccionado éste último por presentar un mayor crecimiento en nuestras aguas, más templadas, frente a aquellas más frías preferidas por *S. solea* (Imsland y col., 2003).

2.1. Importancia comercial y nutricional de *Solea senegalensis*

España es un país pionero en el cultivo de *S. senegalensis* y es el segundo país europeo con mayor producción después de Francia. El lenguado senegalés se ha cultivado durante los últimos años en Galicia, Andalucía, Canarias y Murcia, por orden decreciente en cuanto a su nivel de producción. Hoy en día prácticamente toda la producción de esta especie se centra en las piscifactorías presentes en Canarias y Galicia, mientras que en Andalucía y Murcia llevan dos y seis años, respectivamente, sin producir ejemplares para su consumo de forma relevante. Sin embargo, actualmente se encuentran en fase de construcción varias granjas para la cría de esta especie, lo que supondría un importante avance para el desarrollo de su cultivo en los próximos años (APROMAR, 2015).

El lenguado es un producto muy valorado por los consumidores ya que se trata de un pescado blanco de muy bajo valor calórico, siendo fácil de asimilar y digerir, sobre todo por

el consumidor infantil. Destaca su contenido en proteínas de alto valor biológico y minerales como sodio, potasio, fósforo y magnesio, junto a vitaminas del grupo B (Tabla 2) y un bajo contenido en grasas, pero con una cantidad apreciable de ácidos grasos beneficiosos como los omega-3.

Tabla 2. Composición por 100 g de porción comestible de los principales organismos acuícolas cultivados en España. (Fuente: JACUMAR, 2006). SFA: ácidos grasos saturados; MUFA: Ácidos grasos monoinsaturados; PUFA: Ácidos grasos poliinsaturados.

Especie	Calorías (Kcal)	Proteínas (g)	Grasas (g)	SFA (g)	MUFA (g)	PUFA (g)	Sodio (mg)	Vit. B1 (mg)	Vit. B12 (mg)
Lenguado	81,40	16,50	1,50	0,16	0,24	0,39	100	0,10	1
Dorada	173	17	1	0	0	0	86	0,06	2
Lubina	85,95	18	1,30	0	0	0	79	0,11	3,80
Trucha	169	24	7	2	1	0,55	42	0,10	0
Rodaballo	102	16,10	3,60	0	0	0	84	0,06	2
Anguila	142	18,80	13,60	3	4,60	3	67,20	0,26	2
Besugo	86	17	2	0	0	0	100	0,06	2
Corvina	98	21,40	1,3	0,20	0,14	0,29	104	0,09	1,42
Atún rojo	200	23	12	2,77	2,39	3,09	43	0,16	5

2.2. Cultivo de *Solea senegalensis* y problemas asociados

El lenguado senegalés es un teleosteo marino de cuerpo plano, asimétrico, que ha sufrido un desplazamiento de todas sus estructuras hacia un lado del cuerpo y que posee una forma de vida bentónica en su estado adulto. Se alimenta fundamentalmente de invertebrados como poliquetos, anfípodos, copépodos e isópodos (Drake y Arias, 1989) y, en menor proporción, de moluscos bivalvos y pequeños crustáceos (Abellán y Basurco, 1999; Cabral, 2000; Vieira y col., 2003).

Su desarrollo comienza con la fecundación del huevo (Figura 1A) y una vez superada la eclosión pasan a un estado pelágico en el que se suceden una serie de fases (Figura 1B). Aproximadamente a los 11 días post-eclosión (dpe), las larvas de *S. senegalensis* comienzan el proceso de metamorfosis que, a una temperatura de 19 °C, suele durar hasta el día 17-20 dpe (Fernández-Díaz y col., 2001) (Figura 1C, D, E). Éste es el estadio larvario, que va desde la eclosión del huevo hasta el final de la metamorfosis (Figura 1F). Posteriormente, alcanzan el estadio postlarvario (Figura 1G), que abarca desde el final de la metamorfosis hasta el periodo conocido como “destete”, en el que los ejemplares pasan de tomar un alimento vivo a exclusivamente inerte y/o pienso (Figura 1H).

En la etapa larvaria es fundamental una nutrición de calidad para evitar la existencia de malformaciones esqueléticas durante el desarrollo, problemas de pigmentación y susceptibilidad a enfermedades (Dámaso-Rodriguez y col., 2010; Jobling, 2015; Pohlenz y Gatlin,

2004; Villalta, 2007). Las larvas recién eclosionadas se alimentan durante los primeros días con rotíferos (*Brachionus plicatilis*) y fitoplancton (*Nannochloropsis gaditana* e *Isochrysis galbana*), continuándose con una coalimentación con *Artemia salina* hasta el día 40-60 de cultivo, momento en el que se inicia el “destete” (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999). Esta etapa es crítica para el cultivo del lenguado senegalés y se ha observado que la utilización de hidrolizados de harina de pescado (Day y col., 1999) así como microencapsulados con formulaciones específicas para esta especie (Alarcón y col., 2005; Aragao y col., 2003; Engrola y col., 2005; Sáenz de Rodrigañez y col., 2011) permiten obtener individuos de mayor peso y con mayores tasas de supervivencia (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999; Gamboa-Delgado y col., 2008; Mai y col., 2009). El estadio de alevín comienza al finalizar el periodo postlarvario. En este punto, que transcurre hasta que el individuo entra en el estado juvenil, los ejemplares comen únicamente pienso. Este estadio se divide a su vez en dos fases más, preengorde y engorde. El pertenecer a una u otra fase depende del peso del ejemplar, el cual también es altamente influenciado por la temperatura. La fase de preengorde va de los 5-10 g a 70-100 g aproximadamente, a los 5-6 meses. A los 9-10 meses se alcanza la talla comercial de 300-350 g.

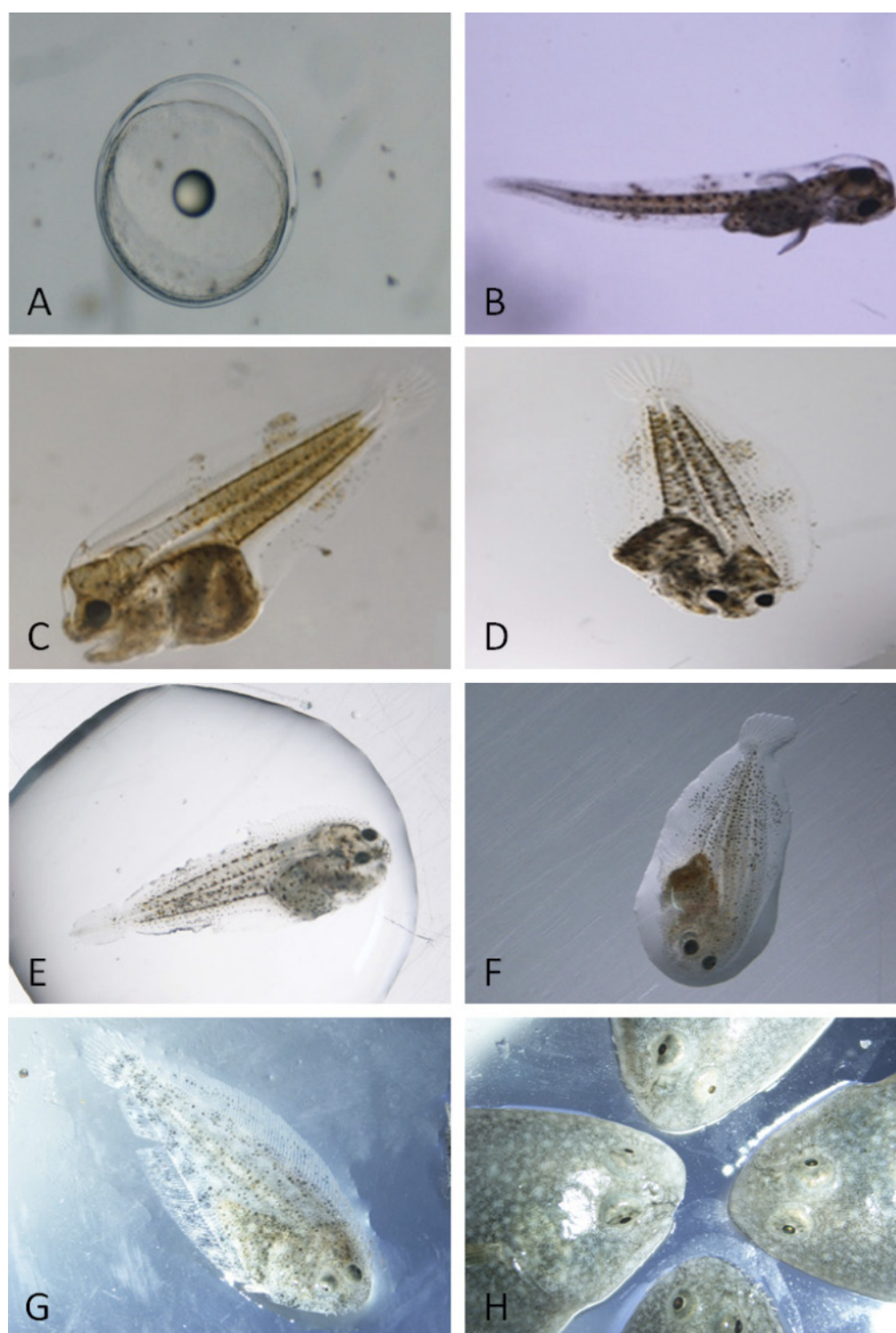


Figura 1. Huevo fecundado (A); Fase larvaria (B, larva pelágica de 6 días de edad; C, inicio de la metamorfosis, 11 días; D y E, fin de la metamorfosis, 17 y 21 días, respectivamente; F, 30-40 días post-eclosión). Fase post-larvaria (G); Fase alevín (H). Fotos cedidas por la Dra. Carmen Lobo del IEO (Instituto Español de Oceanografía, Santander, España).

La etapa de engorde en *S. senegalensis* implica la producción de una gran cantidad de hormonas como las tiroideas (Manchado y col., 2008a), o las implicadas en la reproducción (Guzmán y col., 2009) que, junto a una serie de variables ambientales no siempre bien reguladas, como la temperatura (Guerreiro y col., 2012), la salinidad (Herrera y col., 2012), un exceso de iones en el medio como el yodo o el selenio (Siscar y col., 2014) o periodos de luz-oscuridad (Rasines y col., 2013), repercuten notablemente en el estado fisiológico del pez. Otros factores que influyen notablemente en los ejemplares de esta especie son las distintas proporciones de los componentes de la dieta (proteínas, lípidos, carbohidratos o suplementos), como se puede observar en la Tabla 3. Por ello, uno de los mayores esfuerzos se centra en la mejora y control de estas condiciones, con el fin de aumentar la calidad y producción de los ejemplares desde los estadíos más tempranos (Guerreiro y col., 2012; Pinto y col., 2010), y mantener esa calidad en la etapa adulta (Castro y col., 2012a; Guzmán y col., 2008; Marinho y col., 2012; Rodiles y col., 2012; Villalta y col., 2005a, b).

En la actualidad, los piensos comerciales utilizados en la fase de engorde están constituidos por una dieta seca microparticulada que se formula a base de harina de pescado y de crustáceos planctónicos marinos, soja, aceite de pescado, vitaminas y minerales (JACUMAR, 2013). Desde el año 2000 las dietas para *S. senegalensis* han incrementado su contenido en proteínas y han disminuido en lípidos (Borges y col., 2012). Además, se han obtenido mejores resultados en términos de crecimiento, desarrollo y ausencia de malformaciones, cuando se han sustituido las harinas de pescado por las vegetales (Cabral y col., 2011; Fernández y col., 2012; Valente y col., 2011).

A pesar de ello, algunos individuos siguen presentando alteraciones metabólicas como la esteatosis, que consiste en una proliferación excesiva de peroxisomas en el interior de las células hepáticas debido a excesos de ácidos grasos (Boglino y col., 2012). Esto da lugar a la aparición de inclusiones lipídicas y/o alteraciones en la morfología del hígado (Boglino y col., 2011; Darias y col., 2012; Morais y col., 2005a) que originan necrosis y fibrosis hepática, conllevando en la mayoría de los casos la muerte del animal.

Tabla 3. Componentes de la dieta habitual que tienen repercusión sobre *S. senegalensis* y factores alterados. C: crecimiento; I: respuesta inmunológica; P: pigmentación; Hi: histología del aparato digestivo; D: deformidades óseas; De: desarrollo; S: supervivencia; M: metabolismo; R: reproducción; A: aprovechamiento del alimento; RE: estrés; Mi: cambios en la microbiota intestinal. Los símbolos representan un incremento (↑) o un descenso (↓) en las concentraciones normales. HUFA: ácidos grasos altamente insaturados. EFA: ácidos grasos esenciales. ARA: ácido araquidónico. EPA: ácido eicosapentaenoico. DHA: ácido docosahexaenoico. MOS: manano-oligosacáridos

Etap	Componente	Factores	Referencia	
Larvaria	Lípidos	↑ ARA	P	Villalta y col., 2005b
		↑ EPA	C, S, P, M	Villalta y col., 2008b
		↑ Lípidos	M, De	Morais y col., 2005a,b
		↑ ARA, ↓ HUFA, ↓ EFA	C, M, I Hi, De	Boglino y col., 2012
		Proteína/Lípido	De, P	Boglino y col., 2013
		↑ Lípidos ↑ ARA	C, O, Hi, D	Boglino y col., 2014a,b
	Proteínas	↑ ácidos grasos n-3	M	Bonacic y col., 2016
		Presencia de Taurina	S, M	Pinto y col., 2010
		Origen vegetal	A, C	Silva y col., 2010
	Suplementos		De, M	Fernández-Díaz y col., 2006
↑ Vitamina A		De	Fernández y col., 2009, Darias y col., 2012	
↑ Vitamina C		I, De, M, P	Jiménez-Fernández y col., 2012; 2015	
Engorde	Lípidos	↑ ARA	P	Villalta y col., 2008a
		↑ DHA	C	Villalta y col., 2005a
		↓ ARA	R, S, M	Norambuena y col., 2012a, b; 2013a,b
		↑ Aceites vegetales	M, Hi I	Benítez-Dorta y col., 2013 Montero y col., 2015
		↑ Lípidos	M, E R	Borges y col., 2014 Beirao y col., 2015
	Proteínas	↑ Proteínas vegetales	C, M	Costas y col., 2010
		↑ Aminoácidos (Arg)	R, P, I	Costas y col., 2011b
		↑ Aminoácidos (Gln)	I	Azeredo y col., 2013
		↑ Proteínas	M, C	Marinho y col., 2014
	Carbohidratos	↑ Carbohidratos	Hi, M	Días y col., 2004
		MOS	Hi, S, I	Dimetroglou y col., 2011
	Suplementos	↑ Fósforo	D, M	Salas-Leitón y col., 2015

2.2.1. Estrés

El estrés es una situación en la cual el equilibrio homeostático del individuo se altera como consecuencia de un estímulo intrínseco o extrínseco al mismo, denominado agente estresante (Tort y col., 1998). El organismo responde mediante una serie de cambios en el comportamiento y/o cambios fisiológicos con objeto de compensar y/o adaptarse a la nueva situación (Conte y col., 2004). Estos cambios no ocurren de igual forma, ni en el mismo momento en todos los organismos, ni siquiera dentro de la misma especie (Pankhurst y Van Der Kraak, 2000). En el momento en que el animal detecta una situación de estrés se activan sistemas especializados como el nervioso, endocrino e inmunológico y se liberan sustancias implicadas en la respuesta a dicho estrés (Barton y Iwama, 1991; Van Weerd y Komen, 1998); entre ellas, se encuentra el cortisol, hormona considerada biomarcador de situaciones de estrés en vertebrados, incluidos los peces (Barton y Iwama, 1991; Wendelaar-Bonga, 1997). Si el proceso causante del estrés es un hecho puntual, la situación derivada se conoce como “estrés agudo”, pero si continúa durante un periodo largo de tiempo se denomina “estrés crónico”, ocasionando una disminución en el rendimiento del animal que afecta negativamente a la reproducción, al crecimiento y/o al estado de su sistema inmunitario, y disminuyendo, por tanto, sus probabilidades de supervivencia (Barton, 2002; Maule y col., 1989; Wedemeyer y col., 1990; Wendelaar-Bonga, 1997).

S. senegalensis es una especie bentónica de vida tranquila, poco agresiva y muy vulnerable a situaciones de estrés (Wunderink y col., 2011), como se ha puesto de manifiesto en los estudios llevados a cabo en los diferentes estadios de su desarrollo, demostrándose su efecto perjudicial (Tabla 4). Estos factores pueden implicar procesos tan importantes como inmunosupresión, susceptibilidad a las infecciones y, en el peor de los casos, la muerte de los individuos.

Tabla 4. Principales causas de estrés en *S. senegalensis* y factores que se ven alterados. C: crecimiento; I: respuesta inmunológica; Hi: histología del aparato digestivo; S: supervivencia; M: metabolismo; De: desarrollo; H: niveles de hormonas.

Causas de estrés	Factores	Referencia
Ayuno	M	Costas y col., 2011c
	H	Wonderink y col., 2012
Aireación	I, M	Costas y col., 2011b
	H	Weber y col., 2015
Infección	M	Costas y col., 2013b
	SI	Osuna-Jiménez y col., 2009
	SI	Prieto-Álamo y col., 2009
	SI	Ponce y col., 2011
Manipulación	M, Hi	Cordeiro y col., 2012
	SI, M	Costas y col., 2011a
	H	Costas y col., 2012
	H	Weber y col., 2015
Salinidad	M, C	Arjona y col., 2008
	M	Herrera y col., 2012
Sobrepoblación	M	Costas y col., 2008
	M	Costas y col., 2011b
	I	Costas y col., 2013a
	C, M	Salas-Leiton y col., 2008
	I	Salas-Leiton y col., 2010
Temperatura	H	Arjona y col., 2010
	I	Castro y col., 2012a
	S	García-López y col., 2006
	SI	Manchado y col., 2008
Tóxicos	M, I	Oliva y col., 2012
	I	Osuna-Jiménez y col., 2009
	M	Pinto y col., 2007
	I, M	Prieto-Álamo y col., 2009
	M, C, I	Salas-Leiton y col., 2012a,b
	H, M	Weber y col., 2011
	H	Weber y col., 2012

2.2.2. Patologías de origen infeccioso

La mayoría de las enfermedades infecciosas que afectan a la industria piscícola son de carácter oportunista y asociadas a situaciones de estrés. Todo ello debilita al animal y a sus sistemas de defensa (Gatesoupe y col., 2009), creándose un ambiente propicio para la acción de virus, bacterias, hongos o parásitos (Toranzo y col., 2005). Estos procesos causan importantes pérdidas económicas debido a las altas tasas de mortalidad que se producen y a los costes de los tratamientos (Noga y col., 2011). Si bien en el cultivo del lenguado senegalés, se han descrito infecciones víricas como las causadas por el Virus de la Necrosis Pancreática Infecciosa (IPNV) (Rodríguez y col., 1997), el Virus de la Linfocistis (LCDV) (Alonso y col., 2005; Cano y col., 2010), o el Virus de la Necrosis Nerviosa Viral (VNNV) (Oliveira y col., 2008; Souto y col., 2015), son las enfermedades de tipo bacteriano las que más le afectan (Tabla 5).

Tabla 5. Principales enfermedades bacterianas que afectan a *S. senegalensis*.

Enfermedad bacteriana	Microorganismo patógeno	Referencia
Pasteurelosis	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Zorrilla y col., 1999
		Romalde, 2002
		Magariños y col., 2003
		Arijo y col., 2005a,b
Vibriosis	<i>Vibrio harveyi</i>	Zorrilla y col., 2003
		Arijo y col., 2005a
		Toranzo y col., 2005
	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	Zorrilla y col., 2003 Arijo y col., 2005a
Tenacibaculosis	<i>Tenacibaculum maritimum</i>	Cepeda y Santos, 2002
		Avedaño-Herrera y col., 2005
		Romalde y col., 2005
		Vilar y col., 2012 Costas y col., 2014
Edwardsiellosis	<i>Tenacibaculum soleae</i>	Piñeiro-Vidal y col., 2008b
	<i>Edwardsiella tarda</i>	Castro y col., 2012b

Las soluciones más habituales frente a las infecciones bacterianas, ya sea como método profiláctico o terapéutico, implican el uso de agentes antimicrobianos. Estos son considerados por los acuicultores como remedios efectivos, rápidos y de aplicación sencilla. El modo de administración más frecuente consiste en el vertido del compuesto en el agua de cultivo, junto con el alimento, pero las cantidades que finalmente incorporan los peces no se conocen de forma exacta, bien porque el principio activo se degrada, o bien porque interacciona con sustancias circundantes y sedimenta.

El uso de los antibióticos no se ha hecho siempre de forma responsable, no garantizándose la inocuidad para los organismos que entran en contacto con los mismos, a través del agua o del alimento (Marshall y Levy, 2011). Los efectos derivados del uso sin control de estos agentes son motivo de alarma por la creciente aparición de resistencias bacterianas a lo largo de la cadena alimentaria (Heuer y col., 2009; Marshall y Levy, 2011).

La FAO, la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Oficina Internacional de Epizootias (OIE) y gobiernos de varios países han introducido, modificado o fortalecido los reglamentos sobre el empleo de antimicrobianos en general y, dentro del sector acuícola en particular, con objeto de evitar el uso inadecuado de los mismos (Millanao y col., 2011; Quesada y col., 2013). En los países pertenecientes a la UE, así como en Canadá y Noruega, se ha aprobado una lista muy limitada de antibióticos para ser usados en acuicultura, en los que se especifican las especies a las que están destinadas, sus dosis, duración y el periodo de interrupción que debe respetarse antes del sacrificio, así como las dosis residuales permitidas que pueden permanecer en el tejido del animal (<http://www.fao.org/docrep/016/ba0056e/ba0056e.pdf>). Con estas normativas se asegura que los residuos en los productos se mantengan por debajo de los Límites Máximos de Residuos (LMR) y se minimice el riesgo de que las bacterias patógenas desarrollen resistencias.

Entre los antimicrobianos permitidos, la oxitetraciclina (OTC) es uno de los más utilizados tanto en el cultivo larvario como de engorde (Guichard y Licek, 2006; Lunestad y Goksoyr, 1990; Smith, 2008; Sun y col., 2002; Yuangklang y col., 2005). Es un antibiótico que se absorbe escasamente a través del tracto digestivo de los peces y que, por ello, debe administrarse en dosis altas durante 10-15 días, teniendo en cuenta que las dosis recomendadas no deben exceder los 200 µg/kg (<http://www.fao.org/docrep/016/ba0056e/ba0056e.pdf>), cantidad que ha demostrado ser efectiva en el tratamiento de la vibriosis y la furunculosis en especies como *Salmo salar*, *Ictalurus punctatus*, *Oncorhynchus mykiss* y *S. senegalensis* (Guo y col., 2003; Prescott y Baggot, 1993; Tafalla y col., 1999).

A pesar de todo, debido a las limitaciones en su uso y a sus consecuencias no deseables, es urgente la búsqueda de alternativas a los agentes quimioterapéuticos (Defoirdt y col., 2011; Reverter y col., 2014; Vaseeharan y Thaya, 2014). Entre éstas, cabe destacar las dirigidas a la prevención, como las vacunas (Adams y col., 2009; Arijo y col., 2005; Gudding y Van Muiswinkel, 2013; Secombes, 2011). Sin embargo, su aplicación puede presentar inconvenientes, ya que es un proceso costoso, lento y que requiere un personal capacitado (Gudding y col., 2014; Plant y LaPatra, 2011). Además, muchos antígenos o adyuvantes son susceptibles a la degradación en contacto con el agua (deCollibus y col., 2010), y puede inducir estrés al animal debido al traslado y manipulación de los individuos (Bowden y col., 2003; Braithwaite y Ebbesson, 2014; Lorenzen y LaPatra, 2014).

Otra alternativa puede ser en el uso de inmunoestimulantes (Meena y col., 2013; Ragap y col., 2012), que son sustancias biológicas o productos químicos sintéticos que actúan sobre el sistema inmunitario, potenciándolo y proporcionando al individuo una sobreprotección adicional (Sakai, 1999). Sin embargo, los mecanismos de actuación, hoy en día, no se conocen completamente, son caros y muchos expertos no recomiendan su uso directamente

ya que se ha observado que, cuando se inyectan, se genera un fuerte estrés al animal. Con otras vías de administración se requieren dosis superiores, lo que puede causar el efecto contrario o inmunosupresión (Sakai 1999; Van Hai, 2012).

Una tercera alternativa, que está recibiendo un interés cada vez mayor, es el empleo de probióticos.

3. Probióticos en acuicultura

La OMS (2001) define el término probiótico como “organismos vivos que ingeridos a dosis definidas ejercen efectos beneficiosos para la salud”. Esta definición tiene en cuenta los resultados de recientes investigaciones que demuestran la existencia de probióticos cuyos efectos no se restringen sólo al ámbito intestinal (<http://www.who.int/foodsafety>).

En el campo de la acuicultura la definición más aceptada de probiótico es la descrita por Verschuere y col., (2000), que define a un probiótico como célula microbiana viva, muerta, o componente celular que, al ser administrado a través de la alimentación o en el agua de cultivo, beneficia al hospedador, mejorando la resistencia frente a las enfermedades, el estado de salud, el crecimiento, la utilización de la dieta, la respuesta al estrés o el estado fisiológico en general, obteniéndose al menos en parte, una mejora en el balance microbiano del hospedador o del medio que le rodea.

El flujo constante de agua que pasa a través del sistema digestivo de los peces hace que los microorganismos incorporados con ésta, o con el alimento, tengan un tiempo de residencia en el tracto gastrointestinal muy variable, pero suficiente para producir efectos significativos (ver número de publicaciones en los últimos 15 años en la Figura 2).

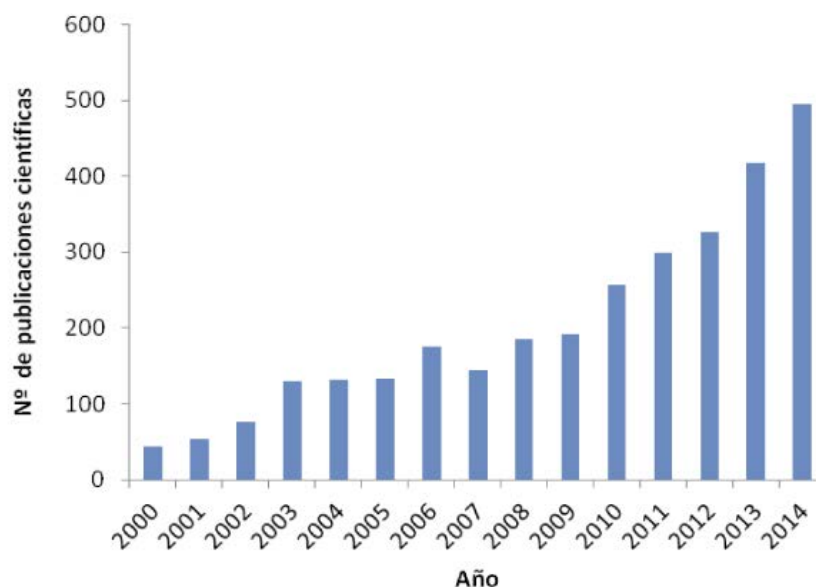


Figura 2. Número de trabajos sobre probióticos aplicados en organismos piscícolas publicados en revistas de impacto en los últimos 15 años. Datos obtenidos de la base de datos ScienceDirect.

Los principales efectos en el organismo tras la aplicación de bacterias probióticas abarcan desde la modulación de los niveles hormonales hasta cambios en la microbiota intestinal, la mejora del crecimiento y la resistencia a las infecciones y al estrés (Gomez-Balcázar, 2008; Giannenas y col., 2015; Merrifield y col., 2010; Pandiyan y col., 2013; Ringo y col., 1998). En la Tabla 6 se resumen las especies acuícolas en las que se han empleado probióticos y sus efectos principales en el organismo.

Tabla 6. Especies acuícolas en las que se han aplicado probióticos y los factores que cambian tras dicha aplicación. I: sistema inmunitario; C: crecimiento. Hi: histología; RE: resistencia al estrés; RI: resistencia a la infección; Mi: microbiota intestinal. M: metabolismo; He: hematología; H: niveles de hormonas; E: actividades enzimáticas; De: desarrollo.



Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Anguila japonica</i> 	<i>Lactobacillus pentosus</i> PL11	RI	Lee y col., 2013
<i>Catla catla</i> 	<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> PTB16	SI, RI	Das y col., 2013
	<i>Bacillus circulans</i> PB7	C, M, SI	Bandyopadhyaya y Mohapatra, 2009

Tabla 6 (cont.)






Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
 Dicentrarchus labrax	<i>Bacillus subtilis</i>	C	Franke y col., 2013
	<i>Lactobacillus casei</i>	SI, RI	Lamari y col., 2013
	<i>Pediococcus acidilactici</i>		
	<i>Vagococcus fluvialis</i>	RI	Sorroza y col., 2012; 2013
		SI	Román y col., 2012; 2013
	<i>Debaryomyces hansenii</i>	SI	Tovar-Ramirez y col., 2010
 Epinephelus coioides	<i>Lactobacillus delbrueckii</i>	SI	Abelli y col., 2009 Picchietti y col., 2009
	<i>Bacillus</i> sp.	C, SI	Sun y col., 2010
 Gadus morhua	<i>Lactobacillus plantarum</i>	C, SI, RI	Son y col., 2009
	<i>Pseudomonas</i> sp. (GP21)	SI	Lazado y Caipang, 2011
	<i>Psychrobacter</i> sp. (GP12)		
	<i>Phaeobacter</i> ssp	RI	D'Alvise y col., 2013
	<i>Arthrobacter</i> sp.	RI, Mi, C	Lauzón y col., 2009; 2010
	<i>Enterococcus</i>		
	Remus ®	RE, SI	Sveinsdottir y col., 2009
	<i>Vibrio</i> sp.		
 Labeo rohita	<i>Microbacterium</i>	RI	Fjellheim y col., 2010
	<i>Ruegeria</i>		
	<i>Pseudoalteromonas</i>		
	<i>Lactobacillus plantarum</i> VSG-3	C, RI, SI	Giri y col., 2013
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> VSG-2	RI, SI	Giri y col., 2012
 Oncorhynchus mykiss	<i>Multispecies</i> (BF + <i>Bacillus subtilis</i> + <i>Lactococcus lactis</i> + <i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	RE	Mohapatra y col., 2012
	<i>Enterobacter</i> sp.	RI	LaPatra y col., 2014
	<i>Lactobacillus paracasei</i> subsp <i>tolerans</i>	C, M	López-Cazorla y col., 2014
	<i>Kocuria</i> SM1 y <i>Rhodococcus</i> M2	C, M RE	Sharifuzzaman y col., 2014
	<i>Bacillus</i> sp.	C	Ramos y col., 2013
	<i>Pediococcus</i> sp.		
	<i>Enterococcus</i> sp.		
	<i>Lactobacillus</i> sp.		
	<i>Pediococcus acidilactici</i>	Mi	Anderson, 2013
	<i>Lactobacillus plantarum</i>	SI, RI	Pérez-Sánchez y col., 2011
	<i>Lactococcus lactis</i>		
	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>		

Tabla 6 (cont.)



Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia	
<i>Oncorhynchus mykiss</i> (cont.)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	SI	Panigrani y col., 2011	
	<i>Kocuria</i> SM1	SI	Sharifuzzaman y col., 2011	
	<i>Rhodococcus</i>			
	<i>Kocuria</i>	SI, RI	Sharifuzzaman y Austin, 2010	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	He	Panigrahi y col., 2010	
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> y <i>Enterococcus faecium</i>	Mi, SI M	Merrifield y col., 2010	
	<i>Bacillus mojavensis</i>	RI	Capkin y Altinok, 2009	
	<i>Enterobacter cloacae</i>			
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C, RI	Pooramini y col., 2009	
	<i>Bacillus subtilis</i> <i>Enterococcus faecium</i> <i>Pediococcus acidilactici</i>	C	Giannenas y col., 2015	
<i>Oreochromis niloticus</i> 	<i>Bacillus subtilis</i>	SI	Telli y col., 2014	
	<i>Rhodobacter sphaeroides</i> WL-APD911	C, SI	Chiu y Liu., 2014	
	<i>Pediococcus acidilactic</i>	SI	Standen y col., 2013	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	C	Abu-elala y col., 2013	
	<i>Bacillus</i> sp.	SI	Del'Duca y col., 2013	
	<i>Enterococcus faecium</i>	C, RI	Wang y col., 2013	
	<i>Lactobacillus acidophilus</i> y <i>Bacillus subtilis</i> C-3102			
	<i>Lactobacillus plantarum</i> subsp. <i>plantarum</i> JCM 1149	SI Mi	Aly y col., 2008 Ren y col., 2013	
	<i>Bacillus subtilis</i> C-310	SI, Mi, H	He y col., 2013	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Hi, SI, Mi	Pirarat y col., 2011	
	<i>Lactococcus lactis</i>	RI, SI	Zhou y col., 2010	
	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	RI	Ngamkala y col., 2010	
	Biogen*	C, M, He	Mehrim, 2009	
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (DVAQUA®)	C, Mi, SI	He y col., 2009	
	<i>Paralichthys olivaceus</i> 	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	C, SI	Won-Seok y col., 2013
		<i>Bacillus</i> sp.	C, SI, RI	Cha y col., 2013
		<i>Lactococcus lactis</i> BFE920	SI, RI, M	Kim y col., 2013

Tabla 6 (cont.)






Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Paralichthys olivaceus</i> (cont.)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus sakei</i> , <i>Bacillus subtilis</i> y <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SI	Harikrishnan y col., 2011
 <i>Salmo salar</i>	<i>Methylococcus capsulatus</i> Bacterias ácido lácticas <i>Lactococcus lactis</i> ssp. <i>lactis</i>	Hi Hi, Mi RI	Romarheim y col., 2013 Navarrete y col., 2013 Ibrahim y col., 2014
 <i>Solea senegalensis</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 <i>Bacillus</i> sp. <i>Pedicoccus</i> sp. <i>Enterococcus</i> sp. <i>Lactobacillus</i> sp.	C, De RI	Lobo y col., 2014a, b Batista y col., 2013
	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella baltica</i>	RI	García de la Banda y col., 2010
	<i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Shewanella baltica</i>	SI, RI	Díaz-Rosales y col., 2009
 <i>Solea solea</i>	<i>Enterococcus faecium</i> <i>Enterococcus faecium</i> IMC511 <i>Bacillus subtilis</i> C-3102 <i>Lactobacillus</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i>	RI, C, RE H C, M, Mi Mi C	Avella y col., 2011 Palermo y col., 2011 Zhigang, 2011 Chandra y Rajan, 2009 El-Nobi y col., 2009
 <i>Salmo trutta</i>	<i>Lactococcus lactis</i> CLFP100 <i>Leuconostoc mesenteroides</i> CLFP196	RI	Balcazar y col., 2009
 <i>Sparus aurata</i>	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11 <i>Bacillus</i> sp. <i>Shewanella putrefaciens</i> <i>Bacillus</i> sp. <i>Bacillus subtilis</i> <i>Vagococcus fluvialis</i> <i>Vagococcus fluvialis</i>	SI C C, E Hi, Mi, SI SI SI	Esteban y col., 2014 Guzmán-Villanueva y col., 2014 Ang y col., 2013 Cerezuela y col., 2013a, b Román y col., 2013 Román y col., 2012

Tabla 6 (cont.)

Especie cultivada	Probiótico	Factor	Referencia
<i>Sparus aurata</i> (cont.)	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	C, RE SI, Mi	Varela y col., 2010 Cordero y col., 2013; 2014
	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus licheniformis</i> + <i>Bacillus pumilus</i>	RE	Avella y col., 2010
	<i>Lactobacillus fructivorans</i> + <i>Lactobacillus plantarum</i>	SI	Abelli y col., 2009

Los probióticos pueden provenir de la microbiota endógena o ser de procedencia exógena. En el primero de los casos, los organismos suelen ser bacterias Gram negativas anaerobias facultativas pertenecientes a los géneros *Vibrio*, *Pseudomonas*, *Aeromonas* y algunos miembros de la familia de *Enterobacteriaceae* (Tabla 6). Las bacterias Gram positivas también son muy utilizadas, pese a que no son dominantes en peces de agua fría (Balcazar, 2006; Kumar y col., 2013b; Lamari y col., 2014; Rengpipat, 2005).

Un aspecto relevante en la preparación de las dietas suplementadas con probióticos es el mantenimiento de la viabilidad de los microorganismos. Numerosos trabajos han abordado el análisis de los efectos de los probióticos tras administrarse como células vivas (Merrifield y col., 2010; Salinas y col., 2008; Vendrell y col., 2008), muertas o rotas (Irianto y col., 2003; Newaj-Fyzul y col., 2007; Panigrahi y col., 2005; Taoka y col., 2006), o liofilizadas (García de la Banda y col., 2010; Merrifield y col., 2011; Panigrahi y col., 2007a, b). Estudios realizados con *Bacillus* S11 (Rengpipat y col., 2008) y *Bacillus subtilis* (Tseng y col., 2009; Zokaefar y col., 2012) administrados en forma de células vivas o liofilizadas, no mostraron diferencias en cuanto a sus efectos producidos. Sin embargo, Panigrahi y col., (2005) concluyeron que las células vivas son la mejor forma de administración.

3.1. Mecanismos de actuación de los probióticos

Los probióticos pueden producir efectos beneficiosos a muchos niveles. Se ha observado que los probióticos contribuyen a la mejora de la calidad del agua empleada en los cultivos, controlando el crecimiento bacteriano (Padmavathi y col., 2012), limitando la necesidad del uso de antimicrobianos y biocidas (Verschuere y col., 2000; Vu y col., 2012), disminuyendo el estrés en los individuos (Zink y col., 2011) y, en consecuencia, favoreciendo el desarrollo de los ejemplares (Ngan y Phu, 2011; Nimrat y col., 2012; Talpur y col., 2013; Zink y col., 2011).

Los probióticos también pueden actuar a nivel del organismo, interactuando con microorganismos patógenos (Dagá y col., 2013; Dorsey y Robertson, 2013; Newaj-Fyzul y col., 2013; Sorroza y col., 2012), a través de los procesos de exclusión competitiva, liberando compuestos antimicrobianos como bacteriocinas y proteasas (Balcázar y col., 2007; Oke y col., 2013; Verschuere y col., 2000). También se ha demostrado que algunos probióticos presentan

efectos antivirales (Chiu y col., 2010; Cordero y col., 2014; Harikrishnan y col., 2010; Kim y col., 2011; Lara-Flores, 2011).

Los probióticos, una vez en el organismo, pueden inmunoestimular al hospedador, competir con las bacterias patógenas por los nutrientes o elementos presentes en el medio e inhibir la adhesión de éstas, bloqueando la vía de penetración (Benhamed y col., 2014; Liu y col., 2013; Naka, 2001; Naka y col., 2013). Además, el uso de los probióticos también puede aumentar la eficiencia de la alimentación mediante la producción de enzimas digestivas (Ang y col., 2013; Askarian y col., 2011; Zacarías-Soto, 2001).

3.2. Los probióticos en el cultivo de *Solea senegalensis*

S. senegalensis presenta en su tracto digestivo bacterias capaces de producir sustancias antimicrobianas frente a microorganismos patógenos que afectan a esta especie, como *P. damsela* subsp. *piscicida* (Makridis y col., 2005). Así mismo, la administración de microorganismos procedentes del tracto digestivo a larvas de esta especie produjo un aumento en la tasa de supervivencia de las mismas (Makridis y col., 2008). Chabrilón y col., (2005a, b; 2006) ensayaron la capacidad de diferentes aislados procedentes de piel de doradas cultivadas para inhibir a patógenos de lenguado, como *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida*, seleccionando dos con actividad antagónica y de adhesión al mucus intestinal de *S. senegalensis*. Estos aislados se identificaron como *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13. Otros ensayos realizados *in vivo* mostraron que *S. putrefaciens* Pdp11 es capaz de estimular el estallido respiratorio en fagocitos de ejemplares de lenguado senegalés que lo recibieron a través de la dieta (Díaz-Rosales y col., 2009). Este hecho podría estar relacionado con la mayor supervivencia frente a *P. damsela* subsp. *piscicida* mostrada por los lenguados que recibieron la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Díaz-Rosales y col., 2009; García de la Banda y col., 2010). Así mismo, ejemplares de lenguados tratados con *S. putrefaciens* Pdp11 mostraron la presencia de anticuerpos con reacciones cruzadas frente a proteínas de la membrana externa de *V. harveyi* y *P. damsela* subsp. *piscicida* (García-Millán y col., 2009), sugiriendo que el tratamiento podría dar lugar a una protección adicional frente a infecciones originadas por estas especies patógenas.

Algunas especies del género *Shewanella* poseen actividad lipolítica, favoreciendo por tanto la absorción de lípidos a nivel intestinal (Olsen y col., 1999, 2000). En este sentido, Sáenz de Rodríguez y col., (2009) y García de la Banda y col., (2010b) observaron efectos a nivel histológico en ejemplares de lenguados senegalés que recibieron una dieta suplementada en *S. putrefaciens* Pdp11. Igualmente, se ha demostrado que su administración a los juveniles se traduce en una mayor tasa de crecimiento, una mayor homogeneidad de pesos entre individuos y un mayor contenido proteico en músculo, sugiriendo que la adición del probiótico a la dieta tiene efectos en los procesos digestivos y produce una mejor utilización de los nutrientes en los peces que lo han recibido (García de la Banda y col., 2009, 2010b; Lobo y col., 2010; Sáenz de Rodríguez y col., 2009).

El efecto beneficioso de esta cepa también se ha observado en otras especies. Varela y col., (2010) observaron una mayor tolerancia al estrés en juveniles de dorada sometidos a una alta densidad de población cuando recibían una alimentación suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, en comparación con los ejemplares alimentados con la dieta control.

Todas estas características descritas han llevado a considerar *S. putrefaciens* Pdp11 como probiótico para la especie piscícola *S. senegalensis*. Sin embargo, aún quedan aspectos por investigar sobre su interacción con el hospedador.

4. Microbiota intestinal de los peces

La microbiota intestinal es el conjunto de microorganismos que viven en el tracto gastrointestinal de un individuo y que mantienen una relación simbiótica de comensalismo o mutualismo con el hospedador (Erkosar y col., 2013; Hooper y col., 2012).

La formación de una microbiota comienza con la adhesión de células microbianas presentes en el agua y la colonización de la superficie de los huevos, que ocurre varias horas después de la fertilización (Olafsen, 2001; Tinh y col., 2008). La microbiota que se desarrollará posteriormente será un reflejo de la composición bacteriana inicial y del ambiente acuático, aunque la capacidad de adhesión específica de dichas células microbianas es la que realmente juega un papel importante en el desarrollo de la microbiota (Hansen y Olfsen, 1999). Después de la eclosión, las larvas de la mayoría de los peces no poseen una boca definida pero deben consumir agua para su osmorregulación, convirtiéndose ésta en una vía para incorporar bacterias al tracto gastrointestinal (Olafsen, 2001). La exposición temprana a altas densidades de bacterias puede ser importante para el desarrollo del sistema inmunitario, como se ha demostrado en el pez cebra (Kanter y Rawls, 2010); además, el establecimiento de una microbiota intestinal adecuada incrementa la supervivencia y mejora el crecimiento larvario (Avella y col., 2010; Carnevali y col., 2006; Gatesoupe, 2008; Tinh y col., 2008).

Se han realizado estudios en los que se determinaron tanto las especies cultivables (Aguilera y col., 2013a, b; Al-Hisnawi y col., 2014; Askarian y col., 2012; Cantas y col., 2011 Merrifield y col., 2009a) como las totales presentes en la microbiota intestinal de peces (Askarian y col., 2012; Merrifield y col., 2013; Sullan y col., 2012). Las bacterias Gram negativas aerobias y anaerobias facultativas constituyen el grupo de bacterias más frecuentemente aisladas en peces marinos y dulceacuícolas, siendo más abundantes en depredadores y peces bentónicos (Duarte y col., 2014; Izvekova y col., 2007). Los microorganismos anaerobios facultativos y anaerobios estrictos suelen encontrarse sobre todo en peces herbívoros, y los primeros en mayor proporción que los segundos (Ringø y col., 1995; Sullan y col., 2012). Los géneros más frecuentemente identificados en peces tanto de agua marina como dulce son *Pseudomonas*, *Aeromonas*, *Carnobacterium*, *Flavobacterium*, géneros de la familia *Enterobacteriaceae* y otros anaeróbicos como *Bacteroides*, *Fusobacterium* y *Clostridium* (Austin, 2006; Gómez y Balcázar, 2008) mientras que, *Vibrio* y *Pseudomonas* se detectan mayoritariamente en peces marinos (Cahill, 1990; Hansen y Olafsen, 1999; Huber y col., 2004; Ringø y Birkbeck 1999; Ringø y Olsen, 1999).

Aunque las especies que constituyen la microbiota de los peces es muy diversa, hay datos que indican que el tracto gastrointestinal posee un núcleo microbiano que se mantiene, independientemente de otros factores, tales como la dieta o la fase de desarrollo (Roeselers y col., 2011). Otros estudios demuestran la existencia de asociaciones microbianas dentro de la microbiota intestinal que co-evolucionan junto al hospedador (Skrodenyte-Arbaciauskiene y col., 2008; Sullan y col., 2012). Las diferencias en la microbiota intestinal pueden ser muy acentuadas cuando factores como la salinidad y la temperatura cambian (Hovda y col., 2012; Jonas y col., 2013; Kim y Kim, 2013; Wong y Rawls, 2012). Así mismo, también influyen las variaciones estacionales (Al-Harbi y Uddin, 2004; Hovda y col., 2012; Pujalte y col., 2003), la dieta (Bolnick y col., 2014; Dimitroglou y col., 2010; Green y col., 2013; Delcroix y col., 2015), la presencia de compuestos antimicrobianos (Gerzova y col., 2014), la anatomía del tracto digestivo (Heikkinen y col., 2006; Ringø y col., 2006), las etapas del desarrollo del pez (Carda-Diéguez y col., 2014; Lauzon y col., 2010a, b; Stephens y col., 2015; Wong y col., 2015) o la genética (Smith y col., 2015), entre otros factores.

En el caso concreto de la microbiota intestinal de *S. senegalensis* los estudios son escasos, aunque se han observado diferencias en su composición según las condiciones de cultivo (extensivo *vs* semi-extensivo) y la época del año (Martín-Antonio y col., 2007). Con respecto a la composición de la microbiota intestinal, las γ -Proteobacterias constituyen las poblaciones mayoritarias de bacterias cultivables en todos los casos, destacando como más abundantes especies de *Vibrio*, *Shewanella* y *Pseudoalteromonas*. También se ha comprobado que pequeñas variaciones estacionales en la temperatura del agua de los circuitos, el hecho de que se trate de un circuito abierto *vs* cerrado o, que la alimentación haya sido natural *vs* comercial, producen cambios importantes en la microbiota (Martín-Antonio y col., 2007; Urdaneta y col., 2012).

4.1. Funciones de la microbiota intestinal de peces

4.1.1. Función metabólica

La presencia de microorganismos en el intestino contribuye a la digestión, absorción y síntesis de nutrientes, así como al metabolismo de algunas sustancias perjudiciales, favoreciendo su eliminación y evitando que el hospedador las incorpore (Ganguly y Prasad, 2012). Además, pueden sintetizar muchos otros compuestos que no son aportados por la dieta o no son sintetizados por el individuo, como ciertas vitaminas, enzimas o factores de crecimiento (Nayak, 2010).

Numerosos estudios realizados en teleósteos han permitido determinar que las dietas ricas en proteínas inducen la producción de enzimas proteolíticas por parte de la microbiota intestinal (Bellwood y col., 2006; Burr y col., 2010; Mantyka y Bellwood, 2007; Mahious y col., 2006; Ray y col., 2012; Sullam y col., 2012; Wong y Rawls., 2012) mejorando la disponibilidad del alimento y la obtención de aminoácidos importantes en numerosas funciones del hospedador (Ray y col., 2012; Roy y col., 2009).

La microbiota intestinal también es capaz de metabolizar carbohidratos simples y complejos (Ibrahim y Anishetty, 2012; Sonnenburg y Sonnenburg, 2014), ácidos grasos de cadena corta como el acetato, propionato (Clements y col., 1994; Mountfort y col., 2002; Seeto

y col., 1996; Smith y col., 1996) y butirato (Smith y col., 1996; Titus y col., 1988), que en especies marinas herbívoras constituyen una fuente importante de energía (Fidopiastis y col., 2006; Seeto y col., 1996). Van Immerseel y col., (2006) han descrito que el butirato posee propiedades antibióticas.

4.1.2. Funciones protectora y estructural

Otra de las funciones de la microbiota es la protectora, que comienza inmediatamente en los individuos tras la eclosión. Actúa como una primera línea de defensa contra los microorganismos patógenos presentes en el medio circundante y en el alimento. Estos microorganismos, junto con otras estructuras especializadas, asociadas a las mucosas (GALT, Gut Associated Lymphoid Tissue), crean el conocido “efecto barrera” (Press y Evensen, 1999).

Una microbiota favorable presenta unos mecanismos de acción muy parecidos a los descritos para los probióticos, como dificultar la adhesión de los patógenos, bien por competencia por el espacio y/o energía disponible (Oke y col., 2013; Pérez y col., 2010). También producen sustancias bactericidas o bacteriostáticas que afectan al desarrollo y crecimiento de otros microorganismos (Dimitroglou y col., 2011, Merrifield y col., 2010; 2011b; Muñoz-Atienza y col., 2011; 2013; Ringø, 2008). Pueden liberar hemolisinas, hidrolizar sales biliares, y producir proteasas, amilasas, celulasas y lipasas (Askarian y col., 2011, 2012; Nayak y col., 2010; Pérez y col., 2010) capaces de desestabilizar la membrana plasmática de muchas bacterias (Bairagi y col., 2002). Igualmente, las moléculas secretadas por los componentes de la microbiota juegan un papel fundamental en la maduración de las respuestas inmunitarias innatas y adaptativas del hospedador (Nayak, 2010; Perez y col., 2010; Rawls y col., 2004; Uma y col., 1999), aunque los mecanismos no son todavía bien conocidos.

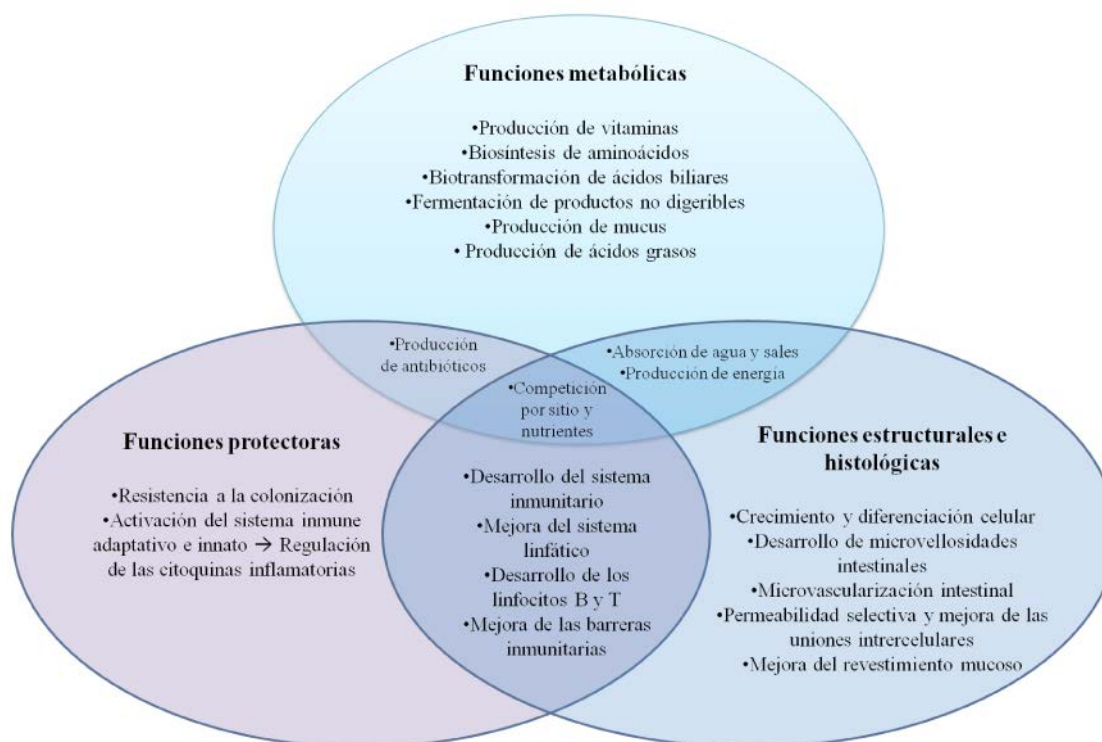


Figura 3. Funciones principales y conocidas desempeñadas por la microbiota intestinal de peces.

La importancia de que se establezca una microbiota intestinal adecuada es tal que su ausencia puede provocar, por ejemplo, la falta de linfocitos B y T en la lamina propia del intestino y por tanto, la ausencia de anticuerpos (Pérez y col., 2010). Así se ha observado un incremento en el número de células T y granulocitos acidófilos en el GALT en larvas de lubina (*D. labrax*) a las que se ha administrado *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* (Pincchietti y col., 2009), cepa bacteriana que había sido aislada precisamente de lubina pero en estado adulto. El GALT además presenta una serie de receptores especializados en sus superficies capaces de discriminar entre moléculas de superficie bacterianas, permitiendo al hospedador distinguir entre microorganismos potencialmente patógenos y microbiota comensal, y así determinar el grado de tolerancia a inducir (Pérez y col., 2010). Muchos de estos receptores forman parte de la familia de *Toll-like* y reconocen lipopolisacáridos y otras moléculas bacterianas características. Estos receptores ayudan directamente a mediar la respuesta inmunitaria activando una serie de procesos que incrementan la expresión de mediadores solubles como citoquinas, TNF- α , IL-1 β , especies reactivas de oxígeno, óxido nítrico, etc. (Mulder y col., 2007; Picchietti y col., 2009). En concreto, cuantificaron los transcritos de genes relacionados con el sistema inmunitario (CD4, CD8- α , COX-2, Ig A, IL-1 β) y el factor beta de crecimiento transformante (TGF- β) como marcadores de inflamación y de inmunidad celular en *D. labrax*.

Cuando la capa mucosa del epitelio intestinal se ve por alguna circunstancia dañada, se altera la adhesión de las bacterias al epitelio del hospedador (Van der Marel y col., 2008) y

los microorganismos patógenos pueden alcanzar localizaciones extraintestinales y, a través de la sangre, pasar al hígado u otros órganos internos (Yano, 1996; Zapata y col., 1996; Ringø y col., 2003; 2007). Este mecanismo, conocido como translocación bacteriana, ha despertado un gran interés en los últimos años por las múltiples implicaciones que, de forma progresiva, se le han ido atribuyendo, sobre todo por su relación con ciertas enfermedades en organismos superiores (Fouts y col., 2012; Wiest y col., 2014). En peces, está bien documentada su contribución al desarrollo de infecciones (Jutfelt y col., 2006; Ringø y col., 2007; 2010; Skirpstunas y Baldwin, 2002). El que suceda la translocación o no, depende de factores interrelacionados como la producción de mucus, la integridad epitelial y en gran medida por el equilibrio de las poblaciones bacterianas presentes en el intestino (Ringø y col., 2007). La situación de equilibrio de las poblaciones microbianas del tracto gastrointestinal se denomina eubiosis, siendo la alteración conocida como disbiosis. Esto último puede ocurrir por numerosos factores que tienen efecto directo sobre la microbiota intestinal o la histología del tracto digestivo como el trasiego del agua y/o alimento (Green y col., 2013; Merrifield y col., 2009b; 2011b) en la que microorganismos se van incorporando o eliminando (Oke y col., 2013; Ringø y col., 2010; Torrecillas y col., 2011b). Normalmente los microorganismos de la microbiota intestinal presentan una mayor capacidad de adhesión al tejido y mucus intestinal, dificultando la colonización de bacterias foráneas (Balcázar y col., 2007; Chabrillón y col., 2005a, 2006; Lara-Flores, 2011; Sica y col., 2012; Torrecillas y col., 2012; Vine y col., 2004).

En cuanto a las funciones estructurales en el caso de *S. senegalensis* están bien documentadas las implicaciones de la microbiota en el desarrollo intestinal, sobre todo en lo que se refiere a la longitud, diámetro y organización de las microvellosidades, favoreciendo una mejor absorción de los nutrientes y colaborando indirectamente en la barrera protectora (García de la Banda y col., 2010; Sáenz de Rodríguez y col., 2009).

Dadas las importantes funciones de la microbiota intestinal en el hospedador, existe un interés creciente en cuanto al conocimiento de las especies que la conforman. Esto permitirá desarrollar nuevas estrategias enfocadas a mejorar el estado nutricional del individuo, y prevenir y tratar enfermedades (Balcázar y col., 2008; Nayak, 2010; Pérez y col., 2010).

En definitiva, el uso de microorganismos probióticos es una de las herramientas con las que se puede contar para inducir cambios en la microbiota del organismo que los incorpora, y tratar de mejorar el estado de salud de los animales acuáticos (Dimitroglou y col., 2011; Kesarcodi-Watson y col., 2008; Merrifield y col., 2009a; Ringø y col., 2010).

4.2. Estudio de la microbiota intestinal de los peces

La aproximación al estudio tanto descriptivo como funcional de la microbiota está adquiriendo un interés creciente. Así, se está abordando el estudio tanto de su composición como del análisis del efecto que ésta puede ejercer sobre la expresión génica, síntesis de proteínas y otros productos del metabolismo (Hooper y col., 2012; Tremaroli y Backhed, 2012; Ursell y col., 2014; Van-Baaren y col., 2013) (Figura 4).

El conocimiento de las especies que constituyen la microbiota intestinal de los organismos es complejo debido a su elevado número (Guaner y Malagelada, 2003; Sears, 2005), y

tradicionalmente, se ha hecho utilizando métodos de cultivo bacteriológicos que sólo recuperan las poblaciones viables y cultivables presentes. Esto describía aproximadamente el 1% del total existente (Amann y col., 1995). Con la llegada de las técnicas moleculares se solventó en parte este problema, llegando a detectarse un porcentaje mucho mayor, pero variable dependiendo del tipo de técnica utilizada (Muyzer y col., 1993, 1998). Entre éstas, se pueden citar las basadas en las cinéticas de re-asociación de ADN o análisis de fragmentos como RAPD (“Random Amplified Polymorphic DNA”), RFLP (“Restriction Fragment Length Polymorphism”) (Marsh y col., 1999; Tiedje y col., 1999), ARDRA (“Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis”) (Martin-Laurent y col., 2001), hibridaciones *in situ* con sondas fluorescentes como el FISH (“Fluorescent In Situ Hybridization”) (Felske y col., 1998; Wallner y col., 1997), y la secuenciación de las moléculas de ADN obtenidas.

Entre las técnicas más comunes para el estudio de la microbiota se encuentra la Electroforesis en Gel de Gradiente Desnaturalizante (DGGE, “Denaturing Gradient Gel Electrophoresis”), que es una herramienta que permite discriminar entre distintas especies microbianas debido a la composición diferencial de nucleótidos que poseen las distintas secuencias de ADN que codifican para ARNr 16S (Muyzer y col., 1993). Este método se basa en la capacidad diferencial de desnaturalización de dicho fragmento de ADN. El ARNr 16S ha permitido un estudio en profundidad de la diversidad, estructura y dinámica de comunidades microbianas en diversos ecosistemas ya que esta molécula confiere una serie de ventajas que la hacen idónea para este tipo de estudio (ver revisión de Andreoni y col., 2004). Además, puede permitir la secuenciación de cada uno de los fragmentos obtenidos y separados en el gel, identificándose así de forma sencilla, y poco costosa, las especies que conforman la microbiota. Esta técnica proporciona una ventaja al estudio mayor que otras técnicas basadas en el análisis de patrones de bandas. Además, puede complementarse con la clonación y posterior secuenciación de los fragmentos de ARNr 16S, para la identificación de las especies (Knapp y Bromley-Challoner, 2003).

Hoy en día el conocimiento de los organismos presentes en un determinado ecosistema, conocido como microbioma, puede llevarse a cabo de forma masiva con técnicas como la secuenciación de metagenomas o la secuenciación de alto rendimiento (“Next Generation Sequencing”, NGS), que son técnicas de análisis de comunidades microbianas completas de cualquier ambiente. Sin embargo, hoy por hoy, a pesar de ser técnicas muy precisas, son mucho más costosas económicamente.

Así, la DGGE sigue siendo la técnica seleccionada debido a la gran cantidad de información que en poco tiempo, bajo coste y relativa facilidad de procesado, es capaz de determinar la composición de las poblaciones con una alta sensibilidad. Esto ha hecho que se haya convertido en una de las técnicas más utilizadas para el análisis de diferentes comunidades microbianas (Cheng y col., 2013; Green y col., 2010; Jousset y col., 2010; Zebulun y col., 2013) incluida la microbiota intestinal (Al-Hisnawi y col., 2014; Dhanasiri y col., 2011; Hovda y col., 2012). Todas ellas nos dan una visión descriptiva de los componentes del sistema, mientras que las características funcionales pueden estudiarse analizando tanto el ARNm para conocer los genes que están expresando en un determinado momento como las proteínas y/u otros metabolitos para conocer los productos finales sintetizados (Figura 4).

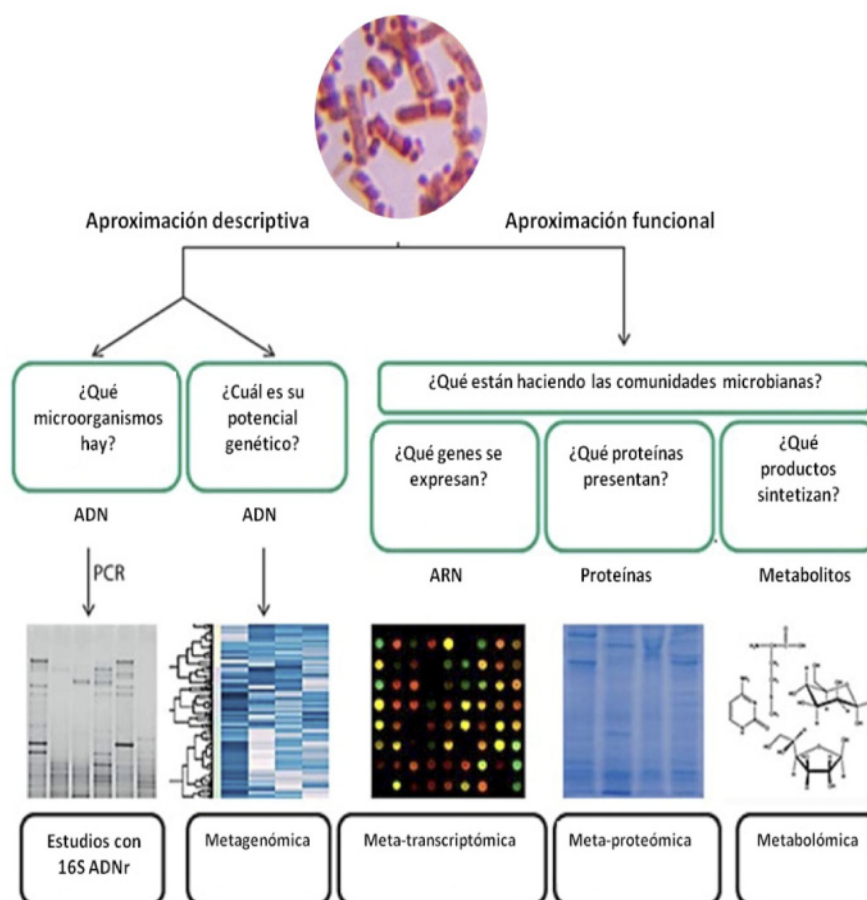


Figura 4. Aproximaciones al estudio funcional y descriptivo de la microbiota de un sistema.

2 HIPÓTESIS

“Lo importante es no dejar de hacerse preguntas”

A. Einstein

2. HIPÓTESIS

La acuicultura está haciendo un uso creciente de los probióticos como herramienta para la producción acuícola. A pesar de que es mucho lo que se conoce sobre los mecanismos de actuación de estos microorganismos, es necesario avanzar en el conocimiento de su interacción con el organismo que lo recibe.

La microbiota intestinal juega un importante papel en el desarrollo de los organismos en general y, dada la administración oral de los probióticos, es interesante considerar si éstos podrían ejercer un efecto modulador de la microbiota intestinal en los peces que los reciben. En este contexto, se plantean distintas cuestiones en relación al uso de los probióticos en peces cultivados como son si la administración a través de la dieta de un probiótico tiene efecto sobre la microbiota intestinal; si el efecto producido sobre la misma es específico de una cepa; si la forma de administración del probiótico resulta determinante en su capacidad de colonizar el tracto digestivo y de influir sobre su microbiota; cuál es el efecto sobre la microbiota intestinal de peces sometidos a un tratamiento antibiótico o a estrés; y, por último, la influencia de la etapa de desarrollo del pez que recibe el probiótico.

La contestación a éstas y otras cuestiones contribuirá no sólo a la mejora de la aplicación de los probióticos a los peces cultivados sino también a obtener el máximo beneficio del uso de éstos sobre el hospedador.

En base a estas premisas, en este estudio se establecen las siguientes hipótesis de trabajo:

- La administración del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 puede modular la microbiota intestinal de especímenes cultivados de *Solea senegalensis* tanto en los estadios larvarios como de engorde, y bajo determinadas circunstancias de cultivo.

- Esta modulación de la microbiota intestinal está relacionada con los efectos probióticos estudiados y asociados a la administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en *Solea senegalensis*.

3

OBJETIVOS

*“El motivo no existe siempre para ser alcanzado,
sino para servir de punto de mira”*

J. Joubert

3. OBJETIVOS

El objetivo global de este trabajo ha sido el análisis de las implicaciones que la administración del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 tiene sobre la microbiota intestinal de ejemplares de *Solea senegalensis* cultivados.

Este objetivo global se ha abordado considerando los siguientes objetivos parciales:

1. Evaluación del efecto ejercido por *S. putrefaciens* Pdp11 y su forma de administración sobre la microbiota intestinal de ejemplares juveniles de *S. senegalensis*.
2. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la expresión génica en hígado de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con una dieta suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 y sometidos a diferentes condiciones de cultivo, como han sido:
 - Tratamiento con el antimicrobiano oxitetraciclina
 - Altas densidades de cultivo
3. Evaluación del efecto sobre la microbiota intestinal de ejemplares larvarios de *S. senegalensis* de la administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia*.

4

MATERIAL Y MÉTODOS

“La técnica es el esfuerzo para ahorrar esfuerzo”

J. Ortega y Gasset

4. MATERIAL Y MÉTODOS

1. Microorganismos probióticos

Para la realización de los ensayos se utilizaron dos cepas probióticas: *Shewanella putrefaciens* Pdp11 y *Shewanella baltica* Pdp13, ambas aisladas en nuestro laboratorio a partir de mucus de la piel de dorada (*Sparus aurata*) sana cultivada. Las relaciones filogenéticas de estos microorganismos se basaron en el árbol filogenético realizado previamente a través del programa “Ribosomal Database Project” (RDP) empleando el sistema de agrupamiento “Neighbour-joining”. El árbol filogenético se construyó comparando las secuencias de una región de 1500 pb que engloba las regiones hipervariables V3-V5 de los genes que codifican para el ARNr 16S de las especies seleccionadas. La distancia filogenética entre secuencias se calculó empleando el algoritmo corregido según Jukes-Cantor (Jukes y Cantor, 1969) que viene dado por la fórmula $d = \frac{3}{4} \log_e (1 - \frac{4}{3}p)$ siendo p la proporción de sitios con nucleótidos diferentes. Para la construcción de dicho árbol se emplearon 28 secuencias de *S. putrefaciens*, 11 de *S. baltica* así como una cepa de *V. harveyi* ATCC 14126T como grupo externo, obtenidas de la base de datos de RDP. En el análisis se incluyeron las cepas *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 (números de acceso GenBank, NCBI: JX415533 y JX415534, respectivamente). La Figura 5 muestra cómo las cepas *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 quedan agrupadas compartiendo una distancia entre ellas menor que con otras cepas de sus respectivas especies, como *S. putrefaciens* E137 y *S. baltica* OS185.

Las cepas *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 utilizadas en este trabajo se cultivaron en caldo tripticasa de soja (Oxoid Ltd., Basingstoke, Inglaterra) suplementado con 1,5% de NaCl (TSBs) durante 18 horas a una temperatura de 22 °C. Las cepas se conservaron en TSBs adicionado con glicerol (2%) a -80 °C hasta su uso. En el momento de su utilización, los contenidos de los viales se descongelaron en hielo y se sembraron en placas de agar tripticasa de soja (Oxoid Ltd) suplementado con 1,5% de NaCl (TSAs), incubándose a 22 °C durante 24 horas y comprobándose siempre la viabilidad y pureza del cultivo. Posteriormente se prepararon suspensiones bacterianas recogiendo en tampón fosfato salino (PBS, pH 7,4) las células bacterianas de la superficie de las placas cultivadas.

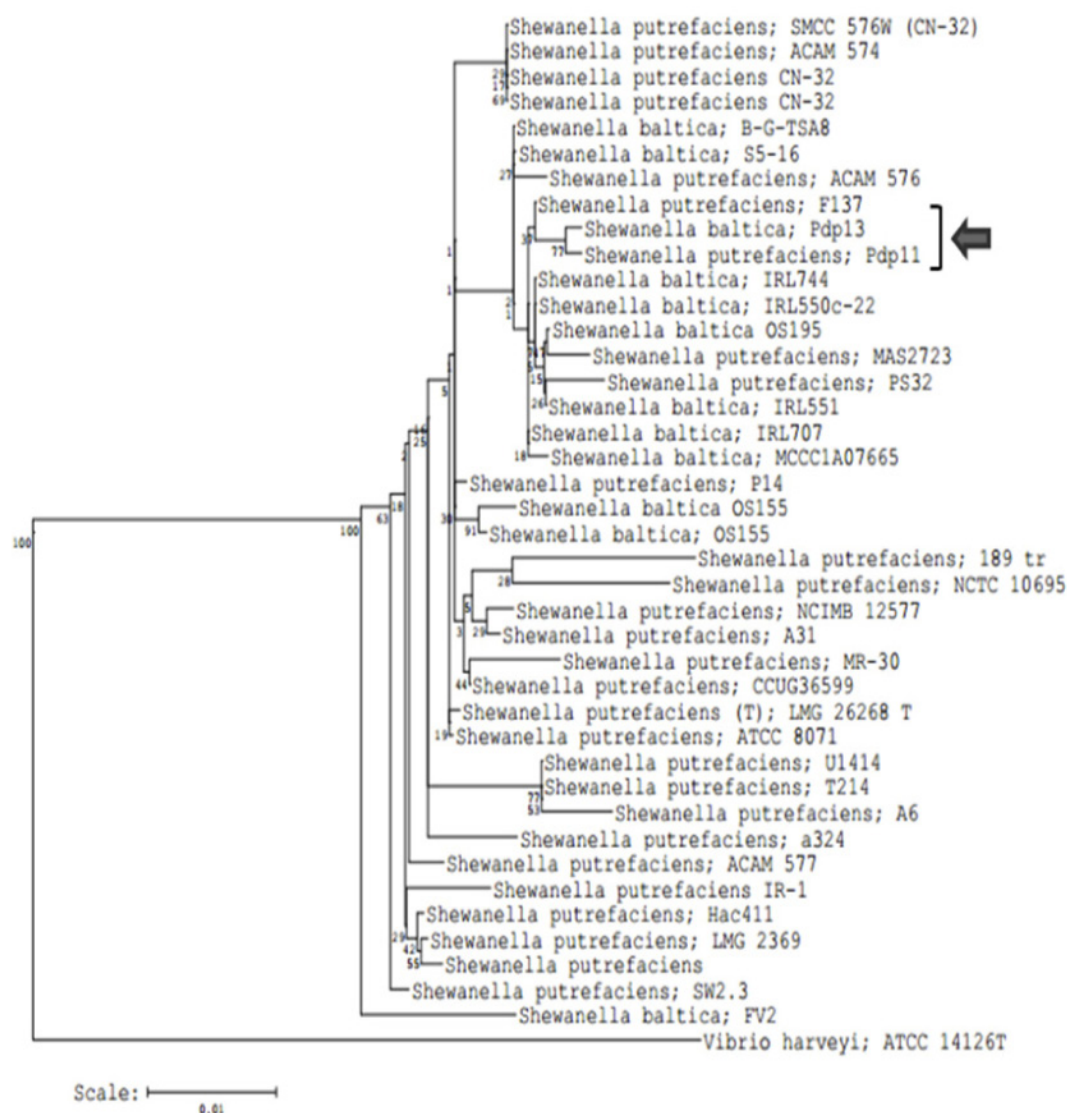


Figura 5. Árbol filogenético construido mediante el método “Neighbour-joining” basado en algoritmos de Jukes-Cantor que muestra la posición de las secuencias del gen ARNr 16S de *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 y de diferentes cepas de *S. putrefaciens* y *S. baltica* presentes en la base de datos GenBank. Se muestran los valores de remuestreo (“bootstrap”) de consenso (500 réplicas) que superan a un valor de 50%. La escala de las barras representa un valor de 0,01 de sustitución por posición de nucleótido.

2. Preparación de las dietas experimentales

2.1. Preparación e incorporación del probiótico en el pienso

S. putrefaciens Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 se sembraron en placas de TSAs y se incubaron a 22 °C, 18h. Tras ese tiempo, las células se recogieron en PBS (12 ml) y las suspensiones bacterianas se ajustaron a una concentración de $1,8 \times 10^{11}$ células ml^{-1} mediante recuento al microscopio. Las suspensiones se centrifugaron a $8000 \times g$ durante 20 min.

En el caso de la preparación para la liofilización de las células probióticas, se eliminó el sobrenadante y las células se congelaron a -80 °C. Posteriormente se liofilizaron durante al menos 12 horas en un liofilizador FTS Flexi-dry modelo FD-1-84D-O (FTS Systems, Inc. NY, Estados Unidos) equipado con una bomba de vacío de 2400 A (Alcatel Cit, Annecy Cedex, Francia). Este último proceso siempre se realizó a una presión de 0,075 mbar. Para comprobar la viabilidad de las células liofilizadas éstas se resuspendieron en PBS y se realizó recuento en placas de TSAs incubadas a 22 °C durante 48 h. Las células bacterianas liofilizadas se resuspendieron en una solución acuosa de alginato de sodio (Sigma- Aldrich, Madrid, España) al 0,5% (p/v), pulverizándose 100 ml de la misma sobre los gránulos de pienso. La mezcla se mantuvo en agitación continua por medio de una amasadora durante 10 minutos. La concentración del probiótico en el pienso (10^9 ufc g^{-1} alimento) se seleccionó basándose en los beneficios obtenidos en *S. aurata* y *S. senegalensis* en estudios previos (Díaz-Rosales y col., 2006; Salinas y col., 2006). Posteriormente, se pulverizó rápidamente una solución de CaCl_2 50 mM (80 ml kg^{-1} , Sigma-Aldrich, Madrid, España) sobre el pienso mantenido en agitación continua en la amasadora. La gelificación del alginato atrapa las células bacterianas en la superficie de los gránulos de pienso. El pienso así adicionado se secó a temperatura ambiente durante 15 minutos, periodo tras el cual estaba listo para su utilización o conservación (4 °C) durante 15 días.

En los experimentos realizados con células probióticas frescas a partir de la suspensión de $1,8 \times 10^{11}$ células ml^{-1} se realizaron recuentos en placa para ajustar a una concentración de 10^9 ufc g^{-1} de pienso. Posteriormente, las células se añaden al pienso, siguiendo la misma metodología descrita anteriormente.

2.2. Bioencapsulación de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en *Artemia* para la alimentación larvaria

La alimentación de las larvas se realizó siguiendo el protocolo descrito por Cañavate y Fernández-Díaz (1999) con modificaciones (García de la Banda y col., 2009). Entre 3 y 9 dpe se añadieron rotíferos enriquecidos con *Nannochloropsis gaditana*, (3×10^5 cel ml^{-1}) e *Isochrysis galbana* (7×10^4 cel ml^{-1}) dos veces al día a los tanques a una concentración suficiente como para mantener una densidad de rotíferos de 20 ejemplares ml^{-1} . Desde 10 dpe y hasta el 60 dpe se introdujo la co-alimentación con *Artemia* y dieta inerte comercial Gemma Micro (proteína cruda 55%, lípidos totales 15%, Skretting, Burgos, España). Entre 10 y 12 dpe se administraron a las larvas nauplios de *Artemia* (variedad AF INVE Aquaculture, Ghent, Bélgica), mientras que a partir de 13 dpe se les proporcionaron metanauplios (variedad EG INVE

Aquaculture, Ghent, Bélgica). Ambos estadios de *Artemia* se enriquecieron previamente con DHA *Super Selco* (INVE Aquaculture, Ghent, Bélgica), durante 18 horas y posteriormente se añadieron a los tanques cuatro veces al día, mientras que la dieta inerte se administró en ocho tomas al día durante todo el experimento. La dosis de *Artemia* se aumentó desde 2 a 14 metanauplios ml^{-1} a lo largo del experimento. El destete transcurrió desde 60 dpe, en que se inició el aumento gradual de la dieta inerte (11,2 g dieta inerte m^{-2} , constituyendo un 45,5% de la comida total) hasta 87 dpe en que se inició la administración sólo de dieta inerte (117 g). La dosis de *Artemia* fue reducida progresivamente desde los 14 metanauplios ml^{-1} hasta ser sustituida por el pienso comercial inerte constituido por un 58% de proteína cruda y un 17% de lípidos totales (Gemma Wean, Skretting, Burgos, España). Al final del experimento, los alevines se alimentaron en una proporción de 7% de la biomasa total existente en cada tanque.

En el caso de los experimentos en los que se suministró el probiótico bioencapsulado en *Artemia*, se realizó un enriquecimiento posterior con *S. putrefaciens* Pdp11 que permitió la encapsulación del mismo. Para ello, se añadió la bacteria a los incubadores de *Artemia* a una concentración de $2,5 \times 10^7$ – $4,5 \times 10^7$ ufc ml^{-1} al menos 3 horas antes de su administración a las larvas y se incubaron a $23 \pm 0,5$ °C. Esta dosis se ha demostrado óptima para concentraciones de presa viva entre 50-400 ejemplares ml^{-1} para la *Artemia* y entre 70-700 ejemplares ml^{-1} para el rotífero (densidades de cultivo habituales en los cultivos auxiliares de las instalaciones piscícolas) (García de la Banda y col., 2013). Tras el periodo de incubación no se detectaron diferencias en la supervivencia de los rotíferos y metanauplios de *Artemia* con probiótico frente al Control. La *Artemia* con el probiótico bioencapsulado se lavó con agua de mar filtrada (1 μm) durante cinco minutos antes de ser añadidas a los tanques de cultivo larvario. Este mismo procedimiento se llevó a cabo con la dieta viva no enriquecida. No se detectaron diferencias significativas en la supervivencia de la *Artemia* con probiótico frente a la no adicionada con el mismo.

3. Análisis de la microbiota intestinal

3.1. Extracción de ADN y realización de PCR

Tanto las larvas como los intestinos conservados a -20 °C se descongelaron paulatinamente en hielo y se extrajo el contenido intestinal presionando hacia los extremos con un objeto estéril. Tras homogeneizar el contenido se tomó una muestra de 50 mg para la extracción de ADN.

El ADN se extrajo en todos los casos siguiendo el protocolo descrito por Martínez y col., (1998) basado en una precipitación salina, con pequeñas modificaciones como se detallan a continuación. Se resuspendieron aproximadamente 50 mg de contenido intestinal o de homogeneizado larvario en 300 μl de tampón de resuspensión y 300 μl de tampón de lisis (ver Anexo). Tras agitar la mezcla vigorosamente, se añadieron 32 μl de una solución de NaCl 6M y proteinasa K (150 μl ml^{-1}) y se incubó a 55 °C durante 2 horas. Posteriormente se añadieron 160 μl de solución de precipitación y se mantuvieron las mezclas en hielo durante 10 min antes de centrifugarlas a 12.000 x g, 3 min. El sobrenadante se traspasó a un tubo

nuevo y se añadió 1 volumen de isopropanol. Tras invertir el tubo unas 25 veces, se mantuvo a temperatura ambiente durante 10 min. Se desechó el precipitado y se incorporaron 500 µl de etanol 70% frío. Las muestras se centrifugaron a 12000 x g durante 2 min, se desechó el sobrenadante y los sedimentos se dejaron secar bien a temperatura ambiente. El ADN extraído se disolvió en 100 µl de agua químicamente pura, estéril y libre de ADNasas y ARNasas.

Para obtener un ADN libre de ARN e impurezas que pudieran inhibir las reacciones posteriores, se realizó un tratamiento consistente en la adición de 1 µl de ARNasa A (10 mg ml⁻¹) (Thermo Scientific, España) e incubación a 37 °C durante 30 min. El ADN se volvió a recuperar añadiendo 1/10 volúmenes de acetato de sodio 3M (pH 6,8) y 2 volúmenes de isopropanol o etanol al 95% a la solución con el ADN. Tras incubar en hielo durante 10 min, se centrifugó a velocidad máxima durante 5 min a temperatura ambiente y se repitió el paso de precipitación con etanol antes de dejar secar el ADN a temperatura ambiente. El ADN se disolvió en agua químicamente pura, estéril y libre de ADNasa y se guardaron alícuotas tanto a -20 °C para conservación a largo plazo, como a 4 °C para su uso inmediato.

El ADN de las células de *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 se extrajo a partir de cultivos puros en TSBs en fase de crecimiento exponencial siguiendo las instrucciones del kit de extracción Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA).

Para conocer la calidad e integridad del ADN, éste se visualizó en geles de agarosa al 1% con bromuro de etidio (0,5 µg ml⁻¹). Como patrón de peso molecular se empleó GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Thermo Scientific). La electroforesis se llevó a cabo con voltaje constante (100 V) durante 40 min en un gel de agarosa al 1% en tampón Tris-Borato-EDTA (TBE), en el que se incluyó un patrón de pesos moleculares GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Thermo Scientific).

La concentración de ADN así como la pureza de las muestras se determinaron a partir de las medidas de absorbancia (A) a 260nm y las relaciones A260nm/A280nm y A260nm/A230nm empleando NanoDrop TM 1000 (ThermoFisher Scientific), considerándose valores entre 1,8-1,9 de absorbancia como adecuados. Las muestras de ADN se diluyeron hasta una concentración de 100 ng µl⁻¹, con la que se procedió a realizar la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Para la amplificación de las secuencias de 500 pb de las regiones V6-V8 del gen ARNr 16S se emplearon los cebadores universales 968-GC-F (5' GGGAACGCGAAGA-ACCTTAC-3'), y 1401-Rv (5' CGGTGTGTACAAGACCC-3') (Kim y Austin, 2006), el primero de ellos con una cola de nucleótidos de CG incorporada. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un volumen de 50 µl, utilizando tubos de polipropileno estériles de pared fina y capacidad para 0,2 ml. La mezcla de PCR contenía 1,25 U Dream Taq polimerasa (Thermo Scientific, Madrid, España), 20 µM Tris-HCl (pH 8,5), 50 mM KCl, 3 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP (dinucleótidos trifosfato), 5 pmol de cada cebador, agua de PCR estéril, pura y libre de ADNasa, 1 µl del ADN de los cultivos puros para las muestras control y 1µl de ADN de cada muestra experimental. Los ciclos se llevaron a cabo en un termociclador T1 (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) y fueron los siguientes: 1 ciclo de 94 °C durante 2 min, 35 ciclos de 95 °C durante 30 s para la desnaturalización, un ciclo de 56 °C durante 40 s para el anillamiento, 72 °C durante 1 min para la extensión,

seguido de un ciclo final de 72 °C durante 5 min. La obtención de amplicones tras la PCR se comprobó mediante comparación del tamaño del producto amplificado con un patrón de pesos moleculares GeneRuler 100 pb Plus DNA ladder (Thermo Scientific), en un gel de agarosa al 1% en TBE.

3.2. Electroforesis en Gel con Gradiente Desnaturalizante (DGGE)

Los productos de PCR obtenidos se separaron por DGGE de acuerdo con las especificaciones de Muyzer y col. (1993) usando un equipo Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). La electroforesis se llevó a cabo en geles (dimensiones 16 x 10 x 0,01 cm) de poliacrilamida al 8% (37:5:1 acrilamida-bisacrilamida) (Sigma-Aldrich, Madrid, España) usando un gradiente desnaturalizante de 30 al 55% de urea y formamida, incrementando en la dirección de la electroforesis. Un 100% de solución desnaturalizante contiene 7M de urea y 40% (v/v) de formamida desionizada. Los productos de PCR (13 µl) junto con 5 µl de tampón de carga, se cargaron en los geles y se sometieron a 200 V durante 10 min y 85 V durante 16 h (Sambrook y col., 1989) a una temperatura constante de 60 °C.

Posteriormente, los geles se tiñeron con nitrato de plata según el protocolo de Sanguinetti y col. (1994) y se secaron a 37 °C durante 24-48 h.

3.2.1. Análisis de los patrones de DGGE

Los geles teñidos se digitalizaron a una resolución de 300 dpi y se analizaron con el programa de análisis de imagen FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Bélgica). De esta forma se determinó el número de bandas (S), la intensidad de cada una de ellas (ni), así como la suma de todas las intensidades (N) de cada muestra (Fromin y col., 2002). La similitud entre patrones de DGGE se determinó mediante el coeficiente de Pearson (Konstantinov y col., 2006) y los valores obtenidos para cada tratamiento se compararon mediante un test de rango múltiple para cada dieta. Los dendrogramas se realizaron mediante el sistema de agrupamiento “Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages” (UPGMA).

El análisis de los patrones de bandas de los geles de DGGE permitió determinar los valores de diferentes parámetros ecológicos. Así, la abundancia de individuos por banda se cuantificó en función de la intensidad de las mismas relativa a la intensidad total de la calle obtenida a partir del análisis de imagen del gel de DGGE, mientras que la abundancia a partir de los clones se determinó por frecuencia de aparición de clones idénticos. A partir de estos valores se calcularon los siguientes parámetros ecológicos:

1. *Índice de diversidad de Shannon* (H') (Shannon y Weaver, 1949), calculado según la expresión:

$$H = -\sum P_i \ln P_i$$

donde, $P_i = ni/N$, ni = número de ejemplares de cada especie, N = número total de ejemplares de todas las especies.

2. *Riqueza de especies* (R), estimada como el número total de bandas.

$$R = \sum b$$

donde b = cada una de las bandas presentes en el gel de DGGE.

3. *Habitabilidad* (Rr), calculada como el número total de bandas multiplicado por el porcentaje de gradiente desnaturante de los agentes urea/formamida del gel necesario para describir la diversidad total de la muestra analizada (Marzorati y col., 2008).

$$Rr = N^2 \times D_g$$

donde, N = número total de bandas en cada calle, D_g = gradiente desnaturante comprendido entre la primera y la última banda de dicha calle.

3.3. Secuenciación de bandas obtenidas en la DGGE

Las bandas predominantes obtenidas en los geles de DGGE se extrajeron del gel mediante escisión de las mismas con una hoja de bisturí y se introdujeron en tubos con 100 μ l de agua químicamente pura, estéril y libre de ADNasas incubándose durante toda la noche a 4 °C. El ADN eluido de los fragmentos de gel se amplificó nuevamente mediante PCR empleando los cebadores 968-F sin la cola CG (5' -AACGCGAAGAACCTTAC-3') y 1401-Rv. La amplificación se realizó en un termociclador T1 thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) e incluyó en un ciclo inicial de 94 °C-2 min, 28 ciclos de 95 °C-30 s para desnaturar, 56 °C-40 s para el anillamiento y un último ciclo de 72 °C-5 min para la extensión. El producto de PCR se comprobó en un gel de agarosa (ver apartado 3.1) y el resto de producto se purificó usando el kit High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche). Tras comprobar la pureza y concentración de ADN obtenidos, las muestras se enviaron para su secuenciación, mediante la técnica de secuenciación capilar, a Macrogen[®] (Korea).

3.4. Clonación de productos de PCR

En los casos en que la cantidad de ADN presente en las bandas de los geles de DGGE fue inferior a la necesaria para la amplificación por PCR, o bien, se obtuvo un patrón de bandas muy juntas que no permitió la escisión de las mismas, se realizó la clonación de los productos de PCR para identificar los grupos taxonómicos predominantes presentes en las muestras. Para ello, los productos de PCR obtenidos como se detalla en el apartado 3.1, se purificaron mediante el kit comercial Genomic Blood DNA Purification Kit (Promega, España), siguiendo el protocolo de la casa comercial y posteriormente se clonaron utilizando el sistema pGEM[®]-T Easy Vector System II (Promega, España) y las células de la cepa *Escherichia coli* JM109 proporcionadas por el mismo kit. El vector de clonación plasmídico utilizado fue pGEM[®]-T vector (Figura 6). Este vector se cortó previamente con la enzima de restricción *Eco* RV y se añadieron residuos de timidina (T) en los extremos 3' del punto de corte, lugar donde se inserta el fragmento de ADN de interés para mejorar la eficiencia de ligación y prevenir la recircularización del mismo.

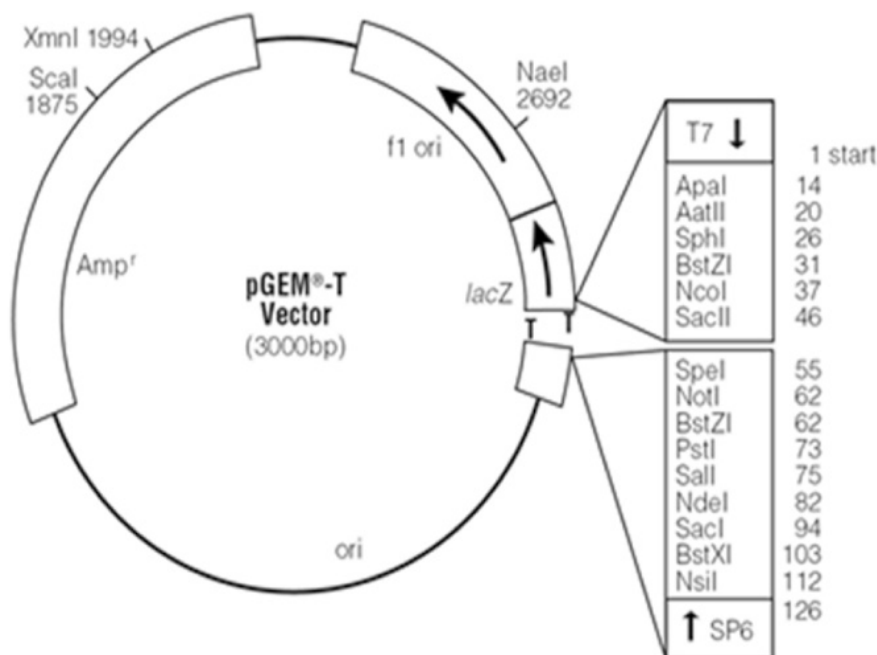


Figura 6. Mapa circular del vector de clonación pGEM[®]T.

La presencia de insertos en las colonias de *E. coli* JM109 transformadas se comprobó mediante PCR empleando los cebadores SP6: (5'- ATTTAGGTGACACTATAG-3') y T7: (5'- TAATACGACTCACTATAGGG-3'). Las reacciones de PCR se prepararon en un volumen total de 50 μ l con los siguientes componentes: tampón PCR, dNTPs hasta alcanzar una concentración final de 200 μ M, 1 U de ADN polimerasa, $MgCl_2$ hasta alcanzar una concentración final de 2 mM, 20 pmol de cada uno de los cebadores y 1 μ l de suspensión celular. Los ciclos empleados fueron: un ciclo de 94 °C-5 min, 30 ciclos de 92 °C-1 min para la desnaturalización, 60 °C-2 min. para el anillamiento y 72 °C-2 min para la extensión.

El producto amplificado se comprobó mediante electroforesis en gel de agarosa tal y como se describe en el apartado 3.1 y se verificó que tenía el tamaño correspondiente al fragmento insertado en el vector (aproximadamente 500 pb).

3.5. Análisis de secuencias

Las secuencias obtenidas a partir del ADN de las bandas de la DGGE así como las obtenidas por clonación presentaron una longitud aproximada de 500-700 pb y se compararon con las secuencias presentes en la base de datos del "National Center for Biotechnology Information" (NCBI) usando el algoritmo BLAST ("Basic Local Alingment Search Tools"). Previamente se determinó que no se trataban de secuencias quimeras usando el programa CHECK CHIMERA del "Ribosomal Database Project" (RDP) (Maidak y col., 1999).

Los clones se hicieron corresponder con sus respectivas bandas en el gel de electroforesis. Para ello, se realizó la PCR de cada clon tal y como se especifica en el apartado 3.1. Poste-

riormente, se realizó una DGGE como se describe en el apartado 3.2. En uno de los pocillos se cargó el ADN amplificado de las muestras de la microbiota intestinal de los ejemplares y paralelamente, el ADN amplificado de cada uno de los clones. Las bandas a la misma altura se consideraron iguales a la identificación obtenida para la secuencia del correspondiente clon.

Las secuencias que presentaron una similitud inferior al 97% con alguna de las presentes en las bases de datos GenBank (perteneciente al “National Center for Biotechnology Information”, NCBI) se consideraron como no identificadas previamente y se depositaron en dicha base de datos.

4. Estudio histológico

El estudio histológico se realizó mediante microscopía óptica. Las observaciones se llevaron a cabo con muestras de intestino e hígados fijados en formalina tamponada al 10% (Merck, España) a temperatura ambiente durante 24 h. Tras el periodo de fijación, las muestras se deshidrataron en una serie gradual de soluciones de etanol (50, 70, 90 y 100%) y se infiltraron en resina hidrofílica JB-4 (Polysciences, Germany). Los bloques se montaron en un microtomo (Microm HM355S, Thermo Scientific, Alemania) y las secciones de 3 μm se transfirieron a portaobjetos cubiertos con silano (TESPA, 3-aminopro-pil-trietoxi-silano; Sigma- Aldrich). Las preparaciones se tiñeron con Hematoxilina-Eosina (HE), y con Azul Alcían (AB, pH 2.5) y ácido peryódico de Schiff (PAS) para detectar diferencialmente las mucinas ácidas y neutras, respectivamente (Mowry, 1963). Las secciones microscópicas se examinaron y fotografiaron bajo un fotomicroscopio Leica 6000B equipado con una cámara Leica DFC280 y el software de adquisición Leica Application Suite V 2.5.0 R1. Las medidas se realizaron utilizando el software de análisis de imagen MIP 4.5 (Consulting Image Digital, Barcelona, España) y NewCAST (Visiopharm, Dinamarca).

El recuento de gotas lipídicas se llevó a cabo contabilizando el porcentaje de campos ocupados por las inclusiones lipídicas contenidas en 200 celdillas microscópicas. Los resultados obtenidos se expresaron como valores medios con sus errores estándar.

5. Estudio de transcripción de genes de *Solea senegalensis*

5.1. Cuantificación relativa de transcritos por PCR a tiempo real (qPCR)

5.1.1. Extracción de ARN y obtención del ADNc

Para la preparación de todo el material y las soluciones utilizadas se empleó agua bides-tilada tratada con 0,1% dietilpirocarbonato (DEPC) para evitar los efectos de las ARNasas.

La extracción de ARN se llevó a cabo utilizando el kit de extracción GeneJET RNA Purification Kit (Thermo Scientific, España) a partir de aproximadamente 300 mg de tejido (hígado) según el protocolo de la casa comercial. La calidad del ARN extraído se evaluó mediante electroforesis en geles de agarosa (1% p/v) en los que se incluyó un marcador de pesos moleculares (RiboRuler™ Low Range RNA Ladder, Thermo Scientific). La cuantificación y

pureza de las muestras se determinó espectrofotométricamente alcanzando valores entre 1,9-2,0 considerado óptimo para el ARN.

Antes de realizar el paso de síntesis de ADNc se trató el ARN con ADNasa I (DNase I, RNase-free, Thermo Scientific, España) durante 10 min a 37 °C y a 65 °C durante 10 min en presencia de EDTA 1M. Tras ello, se sintetizó la cadena complementaria (ADNc) a partir de 1 µg de ARN total usando la enzima transcriptasa reversa SuperScript III reverse transcriptase (Thermo Scientific, España), siguiendo el protocolo de la casa comercial.

5.1.2. Elección de genes de referencia

Para seleccionar los genes de referencia a usar en este estudio se consideraron los genes descritos por Infante y col. (2008). Se utilizaron los cebadores GADPH1 y GADPH2, ACTB1, ACTB2, UBQ, ADNr 18S y eEF1A para amplificar el ADNc de los genes gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa 1 y 2, actina β 1, actina β 2, ubiquitina, subunidad ribosómica 18S y subunidad alfa del complejo de factor de elongación-1, respectivamente (Tabla 7). Todos los análisis estadísticos se realizaron usando el programa RefFinder (Cotton EST Database, 2013) que evaluó la estabilidad de la expresión de los genes candidatos a través de 4 algoritmos diferentes: Delta CT (Silver y col., 2006), BestKeeper (Pfaffl y col.; 2004), Normfinder (Andersen y col., 2004) y Genorm (Vandesompele y col., 2002). A través del programa se calculó una media geométrica de la estabilidad de los genes obtenida a partir de todos los algoritmos utilizados. Posteriormente, se seleccionaron los genes más estables y se escogieron como genes de referencia definitivos aquellos que en la qPCR presentaron valores de Ct similares a lo largo de los diferentes tratamientos.

Tabla 7. Descripción de los cebadores utilizados para el análisis de los genes de referencia. ^aSímbolos de acuerdo con la base de datos de genes del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). ^bTamaño del producto de PCR.

Gen ^a	Nº acceso GenBank	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Longitud (pb) ^b	Referencia
ARNr 18S Subunidad 18S del ARNr	AM882675	F: GAATTGACGGAAAGGGCACCCACG R: ACTAAGAAGGGCCATGCACCCACCAC	148	Infante y col., (2008)
ACTB1 Actina-β1	AB360593	F: CTCATCGTCCACCCGCAAGTGCTTC R: TGTCCATTCGTGCAAGATCGGGAGA	92	Infante y col., (2008)
ACTB2 Actina-β2	DQ485686	F: AATCGTGACCTCTGCTTCCCCCTGT R: TCTGGCACCCCATGTTACCCCATC	113	Infante y col., (2008)
eEF1A1 Factor de elongación α1	AB326302	F: GATTGACCGTCGTTCTGGCAAGAAGC R: CAAAGCGACCAAGGGGAGCAT	142	Infante y col., (2008)
GADPH1 Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	AB300322	F: CAAAGATGGAGGAGTGGCAATCACCGT R: CAAGAAGGTCGTGAAGGCTGCAAGTGA	113	Osuna-Jiménez y col., (2009)
GADPH2 Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa	AB291587	F: AGCCACCGTGTGCGCCGACCT R: AAAAGAGGAGATGGTGGGGGTGGT	107	Infante y col., (2008)
UBQ Ubiquitina	AB291588	F: AGCTGGCCCCAGAAATATAACTGCGACA R: ACTTCTTCTTGGCGCAGTTGACAGCAC	93	Infante y col., (2008)

5.1.3. Realización de PCR a tiempo real (qPCR)

La qPCR se llevó a cabo utilizando placas de 96 pocillos (Axigen Scientific, Francia) cubiertas con una lámina iCycler IQ Optical Tape (Bio-Rad). Las mezclas para la reacción de qPCR se prepararon añadiendo 2 μl del mix de cebadores de forma que la concentración final de cada uno fuera de 0,12 $\mu\text{moles } \mu\text{l}^{-1}$, 5 μl SsoAdvanced SYBR Green Supermix (BioRad), 2 μl de ADNc y agua químicamente pura hasta completar 10 μl . Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador ABI PRISM 7500 instrument (BioRad) con las siguientes condiciones: 10 min a 95 °C, seguido de 40 ciclos de 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C, y finalmente 15 s a 95 °C, 1 min a 60 °C y 5 s a 95 °C. Los cebadores usados se muestran en la Tabla 8. En todos los casos, cada reacción de qPCR se llevó a cabo por triplicado.

Los cebadores empleados en la cuantificación relativa fueron TF, GP96, CASPASA6, NKEP, GPx, NADPHox e IGF β para amplificar el ADNc de los genes transferrina, proteína de choque térmico, caspasa 6, factor potenciador de las células Natural Killer, glutathione peroxidasa, NADPH oxidasa y factor de crecimiento de la insulina, respectivamente (Tabla 8).

El cálculo de la eficiencia de la qPCR se realizó preparando mezclas de reacción para qPCR utilizando diluciones de un número conocido de moléculas de ADNc como sustrato. Finalizada la qPCR se representaron los valores de ciclo umbral (C_t) frente al logaritmo de la concentración de sustrato. La eficiencia (E) se calculó según la siguiente fórmula (Pfaffl, 2001):

$$E = [10^{(-1/m)} - 1] \times 100$$

donde, E es la eficiencia expresada en porcentaje y m es la pendiente de la recta obtenida de la representación C_t vs $\log [\text{ADNc}]$.

5.1.4. Tratamiento de los datos

Las curvas sigmoidales obtenidas tras la amplificación se analizaron utilizando el programa iCycler iQ v3.0 de Bio-Rad. Los valores de C_t proporcionados por el programa se normalizaron aplicando el método ΔC_t usando un gen de referencia (Livak y Schmittgen, 2001) según se indica a continuación:

$$A: 2^{-(C_t \text{ gen de referencia} - C_t \text{ gen problema})} = \text{Expresión bajo la condición experimental}$$

$$B: 2^{-(C_t \text{ gen de referencia} - C_t \text{ gen problema})} = \text{Expresión bajo la condición control}$$

El incremento de expresión para un gen determinado bajo una condición experimental específica se calculó según la siguiente fórmula:

$$A/B = \text{cambio de expresión relativa}$$

Los resultados de la expresión de genes se representaron como incremento relativo (promedio \pm error típico), obtenido al dividir el valor correspondiente para cada muestra entre el valor obtenido para el promedio y el error de sus respectivos controles.

Tabla 8. Descripción de los cebadores utilizados para la cuantificación relativa de la expresión. ^aSímbolos de acuerdo con la base de datos de genes del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). ^bTamaño del producto de PCR. * Cebadores cedidos amablemente por la Dra. María José Prieto-Álamo (Universidad de Córdoba).

Gen ^a	Nº de acceso GenBank	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Longitud (pb) ^b	Referencia
TF Transferrina	FF682265	F: CGTTGTATCGCTCCTCATCTCTGGGTTTG R: CTACTTCAGTGAGAGCTGTGCCCCCTGGAG	119	Prieto-Álamo y col., (2009)
HAMP-1 Hepcidina	FJ263548	F: ATGAAGGCATTCACGCAATTCAGTTGC R: CGKKAMTCCTCAGAACYTRCAGCAG	173	Osuna-Jiménez y col., (2009)
HSP70 Proteína de choque térmico	FF682335	F: CCGTGATCTCAACAAGAGCATCAACCCCTG R: GCCTCCAGCGGTTTCAATTCCCAG	157	*
HSP90AB Proteína de choque térmico	AB513855	F: CCGTGATCTCAACAAGAGCATCAACCCCTG R: GCCTCCAGCGGTTTCAATTCCCAG	157	*
GP96 Proteína de choque térmico	FJ263549	F: GAGTCTTCTCCCTTTGTGAGCGGCT R: TGATGCCCTTCCCTTGGCCACGTTCTG	142	Osuna-Jiménez y col., (2009)
CASPASE6 Caspasa 6	AF212219	R: TGGTCTACACCCCTCCCTGCT F: GCTCCTCATGGACACCTTCC	140	Teles y col., (2011)
NKEF Factor potenciador de las células natural killer	FF682565	F: GGAGTGCTGAAGGAGGACGATGGTATTG R: TCCGTGTTGGTCAAGTGCTGGAAG	137	Prieto-Álamo y col., (2009)
GPx Glutation peroxidasa	BG934453	F: GATTCGTTCCAAACTTCCTGCTA R: GCTCCCAGAACAGCCTGTTG	212	Teles y col., (2011)
NADPHox NADPH oxidasa	AB192465	F: CATCGCCACCTGTTTAACT R: GTATGACCTGCGGATGACCT	250	Teles y col., (2011)
IGF-β Factor de crecimiento de la insulina	AY996779	F: TGCTAGCGCTCTTTCCCTTTCA R: AGAGGGTGTGGCTACAGGAGATAC	100	Benedito-Palos y col., (2007)

5.2. Cuantificación absoluta de transcritos por qPCR

5.2.1. Extracción de ARN total y obtención de ADNc

El ARN total se extrajo a partir de hígados de los ejemplares de lenguados mantenidos en una solución de TRIZOL (Invitrogen, España) tras la toma de muestras, de acuerdo con las instrucciones del fabricante. La contaminación por ADN genómico se evitó con un tratamiento posterior con RNeasy (Qiagen Inc., CA, USA). La calidad del ARN se comprobó usando un bioanalizador Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, España) y posteriormente se cuantificó en el espectrofotómetro mediante la relación de absorbancias A260/A280. En una primera aproximación se procedió a mezclar cantidades iguales de ARN de cada condición experimental.

El ADNc se obtuvo a partir de 2 µg de ARN de cada muestra, junto con M-MLV reversotranscriptasa (Life Technologies) y hexámeros aleatorios (Invitrogen).

Las reacciones de qPCR se llevaron a cabo en un termociclador iCycler iQ Real-Time PCR System (BioRad, Life Technologies SA, España) por cuatuplicado usando mezclas de reacción con la siguiente composición: 50 ng de ADNc, 0,3 µM de cada cebador, 3 mM de MgCl₂, 250 µM de cada dNTP, 0,75 U de Platinum Taq DNA polimerasa y 1:100000 SYBR Green I dye (Roche) en un volumen de 25 µl. Las reacciones se analizaron con el sistema CFX96 Real-Time PCR (BioRad). Las condiciones de los ciclos fueron 2 min a 95 °C para la activación de la polimerasa Taq Platinum y 40 ciclos para la fusión (15 s, 95 °C) y el anillamiento/extensión (30 s, 70 °C). Las réplicas de las reacciones de PCR generaron resultados altamente reproducibles con un error estándar (SEM) <10% de la media (<1% para el ciclo umbral). No se detectaron dímeros de cebadores.

Los cebadores empleados para la cuantificación absoluta fueron HP, HSP70, HSP90AB, NCCRP1, C3, C7, HAMP-1, TNFα, NARS Y g-LYZ para amplificar el ADNc de los genes haptoglobina, proteínas de choque térmico 70 y 90, proteínas receptoras de células citotóxicas no específicas tipo 1, componente del complemento C3 y C7, hepcidina, factor de necrosis tumoral alfa, asparaginil-tRNA sintetasa y g-lisozima, respectivamente. (Tabla 9).

La eficiencia de la PCR en el rango de 20-2x10⁵ pg del ARN total añadido tuvo un ajuste de r>0,98. Posteriormente se realizó una curva de calibración con los valores absolutos de ADNc y sus Ct correspondientes. Dichas moléculas de ADNc se consiguieron partiendo de una misma secuencia de ARN sintetizada *in vitro*. El rango de la curva fue de 10²-10⁹ moléculas de ARN. Por tanto, el número de moléculas transcritas se calculó a partir de la regresión lineal de la curva estándar ($y=3,326x+39,693$ con la que se obtuvo un 100% eficiencia, siguiendo indicaciones de otros autores (Jurado y col., 2007; Prieto-Álamo y col., 2003).

5.2.2. Tratamiento de datos

La normalidad, homocedasticidad e independencia de los datos se analizó con los test correspondientes (test de Levene y tests Kolmogorov-Smirnov/Shapiro Wilk respectivamente). En caso de no cumplirse el requisito de normalidad, los datos se transformaron mediante

una operación matemática simple, como una transformación logarítmica, de manera que finalmente los datos cumplieran dicha condición. En caso de no cumplirse la asunción de homocedasticidad, se aplicó el test no paramétrico T3 de Dunnet o test de Tukey de comparación múltiple, según el caso. Cuando los datos cumplían los requisitos de partida, se aplicó el test de Student. Las diferencias se consideraron estadísticamente significativas cuando $p \leq 0,05$. Todo ello se calculó con el programa informático XLSTAT software (Addinsoft, Spain).

6. Análisis de Componentes Principales

El análisis de componentes principales (APC) se llevó a cabo con el programa informático XLSTAT (Addinsoft, España). Se utilizaron los datos obtenidos para cada una de las variables estudiadas y se calcularon los valores de la idoneidad de Kaiser-Meyer-Olkin y se aplicó el Test de Esfericidad de Bartlett que testa la hipótesis nula en la que la matriz de correlación original es una matriz de identidad. El porcentaje acumulado de la varianza se empleó para determinar el número total de factores a extraer.

Tabla 9. Descripción de los cebadores utilizados para la cuantificación absoluta de la expresión. ^aSímbolos de acuerdo con la base de datos de genes del NCBI (“National Center for Biotechnology Information”). ^bTamaño del producto de PCR. * Cebadores cedidos amablemente por la Dra. María José Prieto Álamo (Universidad de Córdoba).

Gen ^a	Nº de acceso GenBank	Secuencia de los cebadores (5'-3')	Longitud (pb) ^b	Referencia
C3 Componente del complemento C3	FF682240	F: ACCTTAGACTGCCCTACTCTGTGCTGTCCGTG R: GCACTGCACACATCATCCGTCTCAGAC	127	Prieto-Álamo y col., (2009)
C7 Componente del complemento C7	FF682388	F: GGCACACACTATCTGTGCGCAGGGCTC R: GGCGAACGCCCTGATGGTTTAACTCCAG	78	Prieto-Álamo y col., (2009)
NCCRP1 Receptor celular citotóxico no específico proteína	FF682594	F: ATGCCCCGACAGCCTGGACTGG R: CCAACTCAGGTTTCAGGTGGAGGGATG	121	Prieto-Álamo y col., (2009)
HAMPI Hepcidina	FJ63548	F: ACATCTGTGCTCGCCCTTTGTTTGCTTC R: TGACTCCAGCGTCTGTGTCTGACATGATTC	173	Osuna-Jiménez y col., (2009)
NARS Asparaginil-tRNA sintetasa	FF682551	F: ACCCGCAGACACCTGTGTCAGAATACACTCAC R: TTTGAGCACACGGTCCACCACGTC	120	Osuna-Jiménez y col., (2009)
g-LYZ g-lisozima	AB428773	F: ACATAATGGCTGGGGAGACTGGAATCCAAAG R: GAGGTGTTCCCTCGCTGTCCCATTCAC	130	*
TFNa Factor de necrosis tumoral alfa inducido por proteínas	FJ263550	F: CTGGGACTGCTGGCAGCTTGGATTGTG R: CAGTTCTCCAGCGTGACGTACTGTGCGAAC	160	Osuna-Jiménez y col., (2009)
HP Haptoglobina	FF682335	F: CCGTGATCTCAACAAGAGCATCAACCCCTG R: TGAACATCTGTGCGAGGCTCCAGGTTAG	157	Prieto Alamo y col., (2009)
HSP70 Proteína de choque térmico	FF682335	F: CCGTGATCTCAACAAGAGCATCAACCCCTG R: GCCTCCAGGGTTTCAATTCCCAG	157	*
HSP90AB Proteína de choque térmico	AB513855	F: CCGTGATCTCAACAAGAGCATCAACCCCTG R: GCCTCCAGGGTTTCAATTCCCAG	157	*

7. Diseños experimentales

Todos los ejemplares de *S. senegalensis* usados en los experimentos incluidos en la presente tesis se mantuvieron en las instalaciones de Instituto Español de Oceanografía, (IEO) de Santander (España) conforme a las indicaciones especificadas en la legislación española (RD1201/2005 y 32/2007) y la europea (2010/63/UE). Los experimentos incluidos en la presente memoria se plantearon en forma de diseños experimentales. Estos diseños se detallan a continuación.

7.1. Evaluación del efecto ejercido por *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Se emplearon ejemplares de lenguado con un peso de $26,7 \pm 4,6$ g distribuidos a razón de 174 peces m^{-2} en tanques de poliéster de 150 l cubiertos con una red de sombreado. Los tanques se conectaron a un sistema de aireación y renovación de agua de mar en circuito abierto, siendo la temperatura del agua a lo largo del experimento de $16,6 \pm 0,5$ °C y la salinidad de 35,4 g l^{-1} .

El estado de salud de los ejemplares se evaluó analizando 5 ejemplares aparentemente sanos y cogidos al azar, un día antes de cada experimento. El examen visual descartó la presencia de úlceras o lesiones cutáneas en la superficie de los animales. Los ejemplares se diseccionaron y se tomaron muestras de los órganos internos (bazo, hígado y riñón), que se sembraron en placas de agar tripticasa de soja (Oxoid, Hampshire, UK) suplementado con 1,5 % NaCl (TSAs). Todas las placas sembradas se incubaron a 22 °C durante 48 h. Pasado ese tiempo se evaluó la presencia/ausencia de crecimiento microbiano.

Los ejemplares se mantuvieron para su aclimatación en las instalaciones durante dos semanas antes del inicio de los tratamientos experimentales y se alimentaron ocho veces al día con una dieta comercial Gemma 1,8 (50% proteínas y 22% lípidos totales, Skretting, Burgos, España) al 2% de la carga del tanque. Se establecieron 3 grupos de tratamiento, y cada uno de ellos se realizó por duplicado: 1) control, consistente en ejemplares alimentados con la dieta comercial; 2) lenguados alimentados con pienso comercial suplementado con *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizado (10^9 ufc g^{-1}) y 3) lenguados alimentados con la dieta comercial suplementada con *S. baltica* Pdp13 liofilizado (10^9 ufc g^{-1}). La preparación de las dietas experimentales se detalló en el apartado 2.1 de la sección. Los peces se alimentaron con las dietas correspondientes durante 69 días, pero no recibieron alimento las 24 horas anteriores a la toma de muestras, siendo sacrificados por una sobredosis de aceite de clavo (400 ppm) (Farma-Química Sur S.L, Málaga), previamente a la extracción de los órganos. Se sacrificaron 8 ejemplares de cada tratamiento (4 por tanque) obteniéndose el hígado e intestino para su análisis.

El contenido intestinal se almacenó a -20 °C hasta el análisis de la microbiota tal y como se detalla en el apartado 3 de esta sección. Tras el análisis de los geles obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos según se detalla en el apartado 3.2.1 de esta sección. Las bandas del gel de DGGE se identificaron mediante escisión de las mismas, elución del ADN y posterior secuenciación.

La tasa específica de crecimiento (SGR, “Specific Growth Rate”) en peso (%) de los ejemplares durante el experimento se calculó según la fórmula $SGR = [(ln W_t - ln W_0) / (t - t_0)] \times 100$, donde W_t y W_0 son el peso medio individual y el final desde el comienzo del experimento, respectivamente, y t representa el tiempo en días.

Se tomaron muestras de hígado e intestino para su estudio histológico mediante microscopía óptica tal y como se detalla en el apartado 4 de esta sección, se determinó el contenido en grasas mediante recuento de gotas lipídicas en las preparaciones histológicas observadas con los mismos aumentos.

El análisis multivariante de Análisis de Componentes Principales (ACP) se aplicó para correlacionar los valores relativos a niveles de proteínas, lípidos totales y ácidos grasos (omega-3, omega-6, ácido docosahexaenoico, ácido eicosapentaenoico, ácido araquidónico, ácido linolénico y ácido linoleico) (g/100 g de tejido) de hígado de los ejemplares controles y tratados. Estos valores han sido obtenidos en el contexto del proyecto AGL 2011-30381-C03-02 y facilitados por la Dra. Inés García de la Banda del IEO de Santander (España). Estos datos, se correlacionaron junto al número de inclusiones lipídicas cuantificadas tanto en hígado como en intestino, los valores de SGR, los índices ecológicos detallados en el apartado 3.2.1 de esta sección, y la presencia y abundancia de las especies microbianas identificadas y presentes en al menos la mitad de individuos más uno. Para ello, se ha utilizado el programa estadístico XLSTAT software (Addinsoft, Spain).

Con el fin de conocer qué grupos bacterianos contribuyen más a las diferencias en la microbiota observada tras los distintos tratamientos ensayados, se llevó a cabo un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) (Clarke, 1993) a partir de los valores relativos de intensidad de las bandas observadas en los geles de DGGE. Se consideraron aquellas bandas que fueran comunes en, al menos, la mitad más uno de los ejemplares y la intensidad se relativizó a la intensidad total de la muestra. El análisis se realizó mediante el software PAST version 2.17 (Hammer y col., 2001) y los valores fueron calculados como porcentajes de disimilitud (100-%similitud).

7.2. Evaluación de la forma de administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Los ejemplares empleados procedían del mismo lote, tenían la misma talla y se mantuvieron en las mismas condiciones que en el *Diseño experimental 7.1*, a excepción de la temperatura que fue de $18,3 \pm 0,5$ °C.

Se prepararon cuatro dietas: 1) control, consistente en pienso comercial Europa Elite LE2 (59% proteínas y 18% lípidos totales, Skretting, Burgos, España); 2) pienso comercial suplementado con alginato sódico (Sigma-Aldrich, Madrid, España; 2 g kg^{-1} alimento); 3) pienso comercial suplementado con *S. putrefaciens* Pdp11 fresco y 4) pienso comercial suplementado con *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizado. En todos los casos las bacterias se añadieron al pienso en forma de suspensión en alginato sódico según se describe en el apartado 3.1 de esta sección. La duración del experimento fue de 90 días. Los individuos se alimentaron con las

dietas suplementadas durante 60 días y se tomaron muestras de intestino de 5 peces de cada grupo. Los siguientes 30 días únicamente recibieron pienso comercial Europa Elite LE2 y se tomaron muestras de 5 ejemplares por grupo a los 15 y 30 días posteriores a la suspensión de la alimentación con probiótico. Los lenguados se sometieron a ayuno las 24 horas previas a la toma de muestras y antes de la misma se sacrificaron por sobredosis de aceite de clavo (400 ppm).

Los intestinos se extrajeron asépticamente y se conservaron a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis de la microbiota intestinal a partir del contenido intestinal, tal y como se detalla en el apartado 3 de esta sección. Tras el análisis de los geles obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos según se detalla en el apartado 3.2.1 de esta sección. Las bandas del gel de DGGE se identificaron mediante escisión de las mismas, elución del ADN y posterior secuenciación.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) se llevó a cabo entre tratamientos y se realizó como se detalla en el *Diseño experimental* 7.1.

7.3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de *Solea senegalensis* tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11

Se emplearon ejemplares de *S. senegalensis* ($14,6 \pm 0,7$ g de peso) distribuidos aleatoriamente (140 peces por m^2) en tanques de 20-25 cm de altura que contenían 150 l de agua de mar y estaban conectados a un sistema de circuito abierto ($35,4\text{ g l}^{-1}$ salinidad, $19,2\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 0,2\text{ }^{\circ}\text{C}$). El estado de salud, el mantenimiento y alimentación de los peces se llevó a cabo de la misma forma que se detalla en el *Diseño experimental* 7.1.

Una vez superado el periodo de aclimatación se establecieron los siguientes grupos experimentales: 1) control, que incluyó peces alimentados con dieta comercial Gemma 1.8 Diamond (50% proteínas y 22% lípidos totales, Skretting, Burgos, España); 2) peces tratados con oxitetraciclina añadida al pienso comercial, 3) peces alimentados con dieta suplementada con oxitetraciclina y el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11. La oxitetraciclina (OTC, HCL BP2009/EP5, Shangai, China) se incorporó al pienso (40 mg kg^{-1}) mediante homogeneización en una matriz oleosa de aceite de girasol (Koipesol Deoleo SA., Rivas Vaciamadrid, España) según lo descrito por McCracke y col., (1976). El probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 fue añadido al pienso utilizando una solución de alginato sódico como se detalla en el apartado 2.1. El pienso suplementado con el antibiótico se preparó 15 min. antes de su administración.

La dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 y OTC se administró a lo largo de 10 días a razón de 8 tomas diarias ajustando las tomas hasta 20 g/kg de alimento por día. Al final del experimento se tomaron 5 ejemplares de cada tratamiento y se sacrificaron con una sobredosis de aceite de clavo (400 ppm) para la toma de muestras.

El intestino se extrajo de forma aséptica y se conservó a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el análisis de la microbiota intestinal como se detalla en el apartado 3 de esta sección. Tras el análisis de los geles

obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos tal y como se detalla en el apartado 3.2.1. La identificación de los grupos bacterianos presentes en la microbiota intestinal se realizó mediante clonación de los productos de PCR y posterior identificación de las secuencias contenidas en los clones obtenidos (y su correspondencia con las bandas del gel de DGGE) como se detalla en los apartados 3.4 y 3.5 de esta sección.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) se llevó a cabo tal y como se detalla en el *Diseño experimental 7.1* de esta sección utilizando los grupos taxonómicos identificados mediante clonación de los diferentes tratamientos.

Las muestras de hígado se extrajeron e introdujeron inmediatamente en N₂ líquido para su congelación. Posteriormente, se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento para el estudio de la expresión génica mediante qPCR como se detalla en el apartado 6.1 de esta sección. Tras la elección de dos genes de referencia a partir de los analizados (Tabla 7), según se indica en el apartado 5.1.2, la cuantificación de los transcritos se llevó a cabo de forma relativa con los cebadores TF, GPx, HSP70, GP96, CASPASE6, HSP90AB, NADPHox, NKEF, HAMP-1 y IGF- β (Tabla 8).

El análisis multivariante de Análisis de Componentes Principales (ACP) se aplicó para correlacionar aquellos genes cuya expresión mostró diferencias significativas (valores de cambios relativos); todos ellos se analizaron junto con la presencia y abundancia de las especies obtenidas mediante secuenciación de las bandas de DGGE presentes en al menos la mitad de individuos más uno. Para ello, se ha utilizado el programa estadístico XLSTAT software (Addinsoft, Spain).

7.4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de *Solea senegalensis* sometidos a estrés

El efecto de la administración de *S. putrefaciens* Pdp11 a ejemplares de *S. senegalensis* mantenidos a elevadas densidades de población se determinó empleando ejemplares de 22,7 \pm 1,6 g de peso inicial que se distribuyeron en tanques de 150 l (21,7 kg m⁻² de densidad inicial) para los ejemplares mantenidos a alta densidad de población y de 400 l (6,4 kg m⁻² de densidad inicial) para el grupo sometido a una densidad de población normal. El estado de salud, el mantenimiento y alimentación de los peces se llevó a cabo de la misma forma que se detalla en el *Diseño experimental 7.1* excepto para aquellas condiciones que se detallan a continuación.

La renovación (200% h⁻¹) y la temperatura (19,2 \pm 0,5°C) del agua se reguló a lo largo del experimento. Los ejemplares se alimentaron con pienso LE 2 Elite (57% proteínas, 18% lípidos, Skretting, Burgos, España) administrado en 8 tomas diarias. El probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 se incorporó al pienso junto con alginato sódico, siguiendo el protocolo descrito en el apartado 2.1. Los ejemplares recogidos para extracción de muestras, no recibieron alimento el día anterior y se sacrificaron con aceite de clavo (400 ppm) antes de la toma de muestras tanto a día 19 como a día 30 del comienzo del experimento. Cada tratamiento se evaluó por duplicado y se tomaron muestras de 6 ejemplares de cada tiempo y tratamiento

estudiados. Los grupos fueron nombrados como CND y PND para aquellos ejemplares que se mantuvieron a densidad normal con o sin probiótico, respectivamente; y CHD y PHD para aquellos que se mantuvieron a densidad alta, con o sin probiótico, respectivamente. El contenido intestinal se extrajo de forma aséptica y se congeló a -20 °C hasta el análisis de la microbiota intestinal tal y como se detalla en el apartado 4 de esta sección. Tras el análisis de los geles obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos como se indica en el apartado 3.2.1 de esta sección. La identificación de los grupos bacterianos presentes en la microbiota intestinal se realizó mediante clonación de los productos de PCR e identificación de las secuencias contenidas en los clones obtenidos tal y como se detalla en los apartados 3.4 y 3.5 de esta sección.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) se llevó a cabo tal y como se detalla en el *Diseño experimental 7.1* de esta sección utilizando los grupos taxonómicos identificados mediante clonación de los diferentes tratamientos.

Parte del intestino de los lenguados analizados se fijó y se procesó para su estudio histológico como se detalla en el apartado 4 de esta sección. Una vez procesados los tejidos, se realizaron las siguientes determinaciones:

1. Medida del diámetro de la luz del intestino
2. Medida de la altura de las vellosidades (medidas desde la base hasta el ápice)
3. Cuantificación de células caliciformes totales por unidad de área de epitelio (detección de células totales y diferenciación entre células productoras de mucinas ácidas y/o neutras).

Por otro lado, se extrajeron los hígados de los ejemplares e introdujeron inmediatamente en N₂ líquido para su congelación y se conservaron a -80 °C hasta su procesamiento para el estudio de la expresión génica mediante qPCR. Se realizó cuantificación absoluta de los transcritos con los cebadores HP, HSP70, HSP90AB, C3, C7, HAMP1, g-LYZ, NARS, NCCRP1 y TFNAIP9 (Tabla 9), como se detalla en el apartado 5.2 de esta sección.

Posteriormente, se llevó a cabo un ACP para correlacionar la presencia y abundancia de las especies componentes de la microbiota presente en al menos la mitad de individuos más uno (cuantificado como % de clones), los genes cuya expresión mostró diferencias significativas (número de transcritos de moléculas por pg del total de ARN), el número de células caliciformes y la altura de las microvellosidades (µm) en los intestinos mediante el programa estadístico XLSTAT software (Addinsoft, Spain).

7.5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Los huevos empleados en este ensayo procedían de una puesta natural de reproductores de lenguado senegalés (*Solea senegalensis*) mantenidos en cautividad en el IEO de Santander, (España). Los huevos se mantuvieron a $19,0 \pm 0,5$ °C en incubadores cilindro-cónicos con una leve aireación y flujo continuo de agua de $0,5 \text{ l min}^{-1}$ hasta su eclosión. Las larvas recién eclosionadas (40 larvas l^{-1}) se distribuyeron en tanques circulares de poliéster de 280 l de capacidad conectados a un sistema de aireación y renovación de agua constantes. La temperatura del agua se mantuvo a $18,3 \pm 0,8$ °C hasta el día 89 de cultivo, y a $21,0 \pm 1,6$ °C a partir de entonces. La salinidad del agua fue de $35,4 \text{ g l}^{-1}$ a lo largo del experimento. La iluminación (1000 lux en la superficie del agua) se realizó mediante lámparas Minilyn Fast Start (Sylvania, Madrid, España). La iluminación fue continua durante los 10 días posteriores a la eclosión (dpe), y se estableció un fotoperiodo de luz:oscuridad de 12:12 horas hasta 21 dpe. Una vez superada la etapa pelágica, el fotoperiodo fue de 0:24 horas a $< 20 \text{ lux}$ en la superficie del agua (Cañavate y Fernández-Díaz, 1999).

La renovación del agua fue creciente (5% a 80%) en las larvas de 2 a 21 dpe y posteriormente volvió a incrementarse a partir del inicio del destete (58 dpe) de forma gradual hasta alcanzar el 400%. Estas condiciones de renovación de agua mantuvieron unos niveles de oxígeno y nitritos adecuados para el cultivo larvario y postlarvario de los lenguados. En el día 24 dpe, una vez que las larvas superaron la metamorfosis y pasaron a ser bentónicas, se vaciaron los tanques y se determinó la tasa de supervivencia. Posteriormente, los peces de cada tratamiento se distribuyeron al azar en los tanques con una densidad de $6000 \text{ ejemplares m}^{-2}$. Debido a la alta densidad de cultivo, de cada réplica se retiraron ejemplares en estadio postlarvario tras 46 dpe hasta ajustar la densidad a $4000 \text{ ejemplares m}^{-2}$, que se mantuvo hasta el final del experimento.

Se estableció un grupo control alimentado con *Artemia* y un grupo de ensayo que recibió la dieta suplementada con la bacteria probiótica *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulada en *Artemia* en el periodo comprendido entre 10 y 90 dpe. Los ejemplares recibieron alimentación 3 veces al día, cada 8 horas, bien con la dieta control o la suplementada con probiótico. Cada dieta se ensayó por triplicado y se tomaron muestras de 9 ejemplares de cada tratamiento tras 90 dpe.

Para el estudio de la microbiota intestinal se extrajeron los intestinos de los peces y se congelaron a -20 °C hasta su procesamiento como se detalla en el apartado 3 de esta sección. Tras el análisis de los geles obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos como se detalla en el apartado 3.2.1. de esta sección. Las bandas del gel de DGGE fueron identificadas mediante escisión de las mismas, elución del ADN y posterior secuenciación.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) se llevó a cabo entre las especies identificadas en la microbiota intestinal de los peces de los diferentes tratamientos tal y como se describe en el *Diseño experimental* 7.1.

Los valores de supervivencia (%), peso corporal final (mg), longitud final (mm), niveles de proteínas (% peso seco), lípidos totales (% peso seco) y ácidos grasos (g/100 g de tejido) (ácido linoleico, ácido linolénico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenoico, ácido docosahexaenoico), de los ejemplares muestreados se determinaron en el contexto del proyecto AGL 2011-30381-C03-02, y fueron cedidos por la Dra. Inés García de la Banda del IEO de Santander (España).

Los datos de proteínas (% peso seco), lípidos totales, (% peso seco), ratio proteínas/lípidos, aquellos ácidos grasos (g/100 g de tejido) que mostraron diferencias significativas, así como la presencia y abundancia de las especies componentes de la microbiota presente en al menos la mitad de individuos más uno, se analizaron conjuntamente mediante un Análisis de Componentes Principales (ACP) con el programa estadístico XLSTAT[®] software (Addinsoft, Spain).

7.6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Los huevos y embriones se obtuvieron siguiendo la metodología indicada en el diseño anterior (*Diseño experimental* 7.5). Tras la eclosión, las larvas se mantuvieron también en tanques con agua de mar (salinidad 35,4 g l⁻¹) de forma similar al experimento anterior. La temperatura osciló entre 17,8 ± 0,8 °C (1-56 dpe), 18,9 ± 0,4 °C (57-85 dpe) y 19,6 ± 1,1 °C (85-119 dpe). La iluminación se mantuvo como se describe en el *Diseño experimental* 7.5.

Una vez que las larvas superaron la metamorfosis y pasaron a ser bentónicas (26 dpe), los peces de cada tratamiento (Control y Pdp11) se distribuyeron al azar por triplicado en tanques con una densidad de 3000 ejemplares m⁻². Así mismo, debido a la alta densidad de cultivo el día 41 de cultivo se retiraron postlarvas de cada réplica para ajustar la densidad a 2500 ejemplares m⁻² en cada tanque. Finalmente, después de finalizado el destete (87 dpe) se vaciaron todos los tanques y los alevines se redistribuyeron con una densidad de 1250 ejemplares m⁻² hasta el final del experimento (119 dpe).

La alimentación de los peces se realizó según el protocolo descrito por Cañavate y Fernández-Díaz (1999), y se describe en el diseño anterior. Se estableció un grupo control alimentado con *Artemia* (control) y un grupo tratado que recibió la dieta suplementada con la bacteria probiótica *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) encapsulada en *Artemia* entre 10 y 30 dpe. A partir de 30 dpe ambos grupos fueron alimentados con *Artemia* Control (4 veces) y pienso comercial (8 veces). Cada dieta se ensayó por triplicado. Se tomaron muestras de intestinos de 6 ejemplares de cada tratamiento a lo largo del desarrollo (23 dpe: final de la metamorfosis; 56 dpe: inicio del destete; 87 dpe: finalización del destete y 119 dpe: dieta inerte) de forma aséptica para el análisis de la microbiota y se congelaron a -20 °C hasta su procesamiento según se detalla en el apartado 3 de esta sección. Tras el análisis de los geles obtenidos mediante DGGE, se realizó un dendrograma y se calcularon los índices ecológicos según se detalla en el apartado 3.2.1 de esta sección. La identificación de los grupos bacterianos se realizó tras la clonación de los productos de PCR y secuenciación de los insertos obtenidos como se detalla en los apartados 3.4 y 3.5 de esta sección.

El análisis de porcentaje de similitud (SIMPER) se llevó a cabo como se detalla en el *Diseño experimental 7.1* de esta sección utilizando los grupos taxonómicos identificados mediante clonación de las muestras de los diferentes tratamientos.

5

RESULTADOS

*“Un optimista ve una oportunidad en toda calamidad.
Un pesimista, ve una calamidad en toda oportunidad”*

W. Churchill

5. RESULTADOS

1. Evaluación del efecto ejercido por *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

1.1. Crecimiento de los ejemplares en cultivo

Los resultados obtenidos en este estudio mostraron que las tasas de crecimiento específico (SGR) de los ejemplares juveniles de lenguado alimentados durante 69 días con una dieta comercial y la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) ($0,7\% \text{ día}^{-1}$ y $0,6\% \text{ día}^{-1}$, respectivamente) frente a las de los ejemplares que recibieron la dieta con *S. baltica* Pdp13 ($0,5\% \text{ día}^{-1}$) (Tabla 10). La supervivencia final registrada fue del 100% para todos los grupos experimentales.

1.2. Composición de proteínas y ácidos grasos

Los resultados obtenidos tras analizar el contenido proteico y lipídico de los hígados de los ejemplares que recibieron las distintas dietas se resumen en la Tabla 10. No se detectaron diferencias estadísticamente significativas en los valores de proteínas y lípidos totales, del ácido araquidónico (ARA) y ácido eicosapentanoico (EPA). Por el contrario, los niveles hepáticos del ácido docosahexaenoico (DHA) fueron significativamente inferiores en los especímenes que recibieron ambos probióticos ($17,3 \text{ g/100 g}$ para *S. baltica* Pdp13 y $19,3 \text{ g/100 g}$ para *S. putrefaciens* Pdp11) respecto a los peces Control ($21,4 \text{ g/100 g}$). Los valores de omega-6 (n-6) fueron significativamente superiores en los grupos alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 ($8,6 \text{ g/100 g}$) y *S. baltica* Pdp13 ($8,8 \text{ g/100 g}$) comparados con el Control ($7,3 \text{ g/100 g}$). También se observaron incrementos significativos ($p < 0,05$) en los niveles de los ácidos linolénico ($18:3n-3$) y linoleico ($18:2n-6$) de los peces alimentados con las dietas suplementadas con *S. baltica* Pdp13 ($1,5 \text{ g/100 g}$ y $7,1 \text{ g/100 g}$, respectivamente) y *S. putrefaciens* Pdp11 ($1,4 \text{ g/100 g}$ y $6,8 \text{ g/100 g}$, respectivamente) comparados con el grupo Control ($0,8 \text{ g/100 g}$ y $5,1 \text{ g/100 g}$, respectivamente).

Tabla 10. Valores de tasa de crecimiento específico (SGR) (% peso/día) y porcentajes de proteínas, lípidos totales y ácidos grasos (g/100 g de tejido) medidos en hígado de *S. senegalensis* alimentados con la dieta comercial (Control), suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *S. baltica* Pdp13 (Pdp13). El contenido en ácidos grasos está expresado en % del contenido total de lípidos. Los valores están expresados como la media ± desviación estándar. ^aIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la dieta Control. ^bDiferencias significativas ($p < 0,05$) respecto a la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11). SGR: tasa de crecimiento específico.

	Control	Pdp11	Pdp13
SGR peso (%)	0,7 ± 0,1	0,6 ± 0,1	0,5 ± 0,1 ^{ab}
Proteínas totales	36,6 ± 6,6	32,7 ± 2,2	29,4 ± 5,2
Lípidos totales	34,8 ± 4,0	37,9 ± 2,3	39,7 ± 6,7
Omega-3 (n-3)	35,4 ± 7,3	32,6 ± 1,4	31,5 ± 3,8
Omega-6 (n-6)	7,3 ± 0,9	8,6 ± 0,4 ^a	8,8 ± 0,3 ^a
Ácido docosahexaenoico (22:6n-3 DHA)	21,4 ± 1,6	19,3 ± 1,3 ^a	17,3 ± 0,7 ^a
Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3 EPA)	4,1 ± 1,2	4,0 ± 0,8	4,1 ± 1,3
Ácido araquidónico (20:4n-6 ARA)	2,3 ± 0,9	1,8 ± 0,4	1,7 ± 0,2
Ácido linolénico (18:3n-3)	0,8 ± 0,1	1,4 ± 0,0 ^a	1,5 ± 0,1 ^a
Ácido linoleico (18:2n-6)	5,1 ± 0,2	6,8 ± 0,2 ^a	7,1 ± 0,2 ^a

1.3. Análisis de la microbiota intestinal

El dendrograma obtenido a partir del análisis de similitud empleando el coeficiente de Pearson a los patrones de bandas observados en los geles de DGGE se muestra en la Figura 7. La incorporación en la dieta de *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 dio lugar a un alto porcentaje de similitud intragrupo (78% y 97%, respectivamente), mientras que este porcentaje fue del 58% en peces que recibieron la dieta control.



Figura 7. Dendrograma obtenido a partir del análisis del patrón de bandas de los geles de DGGE de la microbiota intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con una dieta comercial (Control) y ejemplares alimentados con las dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *S. baltica* Pdp13 (Pdp13) a lo largo de 69 días.

Los valores de diversidad (H'), de riqueza de especies (R) y la habitabilidad (R_r) calculados a partir del análisis de los patrones de DGGE obtenidos se muestran en la Tabla 11. La microbiota de los lenguados alimentados con la dieta Control o suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 presentó valores similares de R ; sin embargo, la diversidad de la microbiota intestinal de los lenguados alimentados con la dieta Pdp13 mostró un valor significativamente inferior en comparación con los valores de los grupos Control y dieta suplementada con *S.*

putrefaciens Pdp11. En el caso de la habitabilidad, o Rr, los valores fueron significativamente superiores cuando la dieta estaba suplementada con alguno de los probióticos.

Tabla 11. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (Rr) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dieta comercial (Control) o suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) o *S. baltica* Pdp13 (Pdp13). ^aIndica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al grupo Control; ^bIndica diferencias significativas ($p<0,05$) entre la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 y la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11.

Dieta	H'	R	Rr
Control	2,5 \pm 0,1	26,7 \pm 0,6	58,0 \pm 0,0
Pdp11	2,4 \pm 0,0	27,0 \pm 1,0	78,0 \pm 0,0 ^a
Pdp13	1,8 \pm 0,0 ^{ab}	26,0 \pm 0,0	97,0 \pm 0,0 ^{ab}

Con objeto de conocer la composición de la microbiota intestinal de los peces alimentados con las dietas ensayadas, se recortaron las bandas que mayor intensidad mostraron en los geles de DGGE y sus secuencias se compararon con las secuencias presentes en la base de datos GenBank (NCBI). Todas las secuencias obtenidas estuvieron relacionadas con secuencias correspondientes a γ -Proteobacterias, excepto una que se relacionó con una bacteria no identificada pero aislada de mucus de la especie marina *Oculina patagonica* (banda 37) (Tabla 12).

En los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 se detectó una banda que estaba presente sólo en estos ejemplares (banda 16) y que se relacionó con un 99% de similitud con *S. putrefaciens* Pdp11. Las bandas detectadas sólo en los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 se relacionaron con *S. decolorationis* CCTCCM 203093T (banda 26), *S. piezotolerans* WP3 (banda 31) y *S. baltica* Pdp13 (banda 30). Por el contrario, las bandas número 25 y 27 relacionadas con *S. putrefaciens* ZH29 y *Shewanella* MJ 5323, respectivamente, sólo aparecieron en los patrones de DGGE de los individuos de las dietas suplementadas con probióticos. Por otro lado, bandas relacionadas con *V. penaeicida* DSM14 (banda 19), *V. breoganii* RD 2B2 (banda 20) y *Vibrio* sp. SB-E2g (banda 23) fueron los únicos que se detectaron en lenguados alimentados con las 3 dietas ensayadas.

La suma de intensidades de las bandas correspondientes a especies del género *Vibrio* fue del 57,62% en los peces Control, valor que disminuyó al 39,17 % en los individuos que recibieron la dieta con *S. putrefaciens* Pdp11, y 10,64 % en los que recibieron la dieta con *S. baltica* Pdp13. En cuanto a las especies del género *Shewanella*, se observó que representaban el 34,21% de la intensidad total en los individuos Control, aumentó a 58,76% cuando se administró *S. putrefaciens* Pdp11 y llegó a representar el 87,16% de la intensidad total en los lenguados alimentados con *S. baltica* Pdp13.

Tabla 12. Identificación de las bandas de los geles de DGGE presentes en más del 50% de los peces de cada grupo; porcentaje de similitud de la secuencia de ADN_r 16S con las secuencias presentes en la base de datos GenBank; número de acceso y valores medios de la intensidad de las bandas (relativa a la intensidad total de la muestra). Los valores de desviación típica fueron inferiores a 0,1%. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta comercial (Control), suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *S. baltica* Pdp13 (Pdp13).

Nº banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje de intensidad (%)		
				Control	Pdp11	Pdp13
γ-Proteobacteria						
5	<i>Shewanella</i> sp. ANA-3	99	CP000469	17,10	0	12,97
27	<i>Shewanella</i> MJ 5323	97	DQ531951	0	11,48	12,24
1	<i>Shewanella baltica</i> clon GR-WP39-25	92	AJ301575	9,00	8,78	0
30	<i>Shewanella baltica</i> Pdp13	98	JX415534	0	0	24,50
26	<i>Shewanella decolorationis</i> CCTCCM 203093T	96	AJ609571	0	0	19,46
31	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	95	AJ551090	0	0	14,40
3	<i>Shewanella putrefaciens</i>	91	HQ588327	8,11	8,11	0
16	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	99	JX415533	0	17,56	0
25	<i>Shewanella putrefaciens</i> ZH29	99	HM103349	0	12,83	3,59
9	<i>Vibrio</i> sp. clon 2 no cultivado	97	AY785249	16,22	8,78	0
23	<i>Vibrio</i> sp. SB-E2 g	91	AB457052	4,48	10,81	3,59
6	<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 609	99	FM204870	22,52	6,08	0
20	<i>Vibrio breoganii</i> RD 2B2	94	EU931113	2,70	9,45	3,59
19	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	99	AJ421444	11,70	4,05	3,46
Bacterias no identificadas						
32	Bacteria clon 19	96	AY654742	8,11	2,02	2,16

Para determinar la contribución de cada banda a las diferencias observadas en los patrones de DGGE de la microbiota intestinal de los lenguados alimentados con las distintas dietas ensayadas se realizó un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) (Tabla 13).

Las bandas 16 (*S. putrefaciens* Pdp11), 27 (*Shewanella* MJ 5323), 6 (*V. alginolyticus* CECT 609), y 25 (*S. putrefaciens* ZH29) contribuyeron a más del 50% de la disimilitud entre la microbiota de los peces Control y los alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11. Por otro lado, las bandas 6 (relacionada con *V. alginolyticus* CECT 609), 5 (*Shewanella* ANA-3), 31 (*S. piezotolerans* WP3), 30 (*S. baltica* Pdp13) y 26 (*S. decolorationis* CCTCCM 203093T) fueron responsables de las diferencias en la microbiota de los lenguados tratados con las dietas suplementadas con *S. baltica* Pdp13 respecto a los controles. Finalmente, las diferencias en la microbiota de los lenguados alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 o *S. baltica* Pdp13 se

debieron principalmente a las bandas 16 (*S. putrefaciens* Pdp11), 31 (*S. piezotolerans* WP3), 30 (*S. baltica* Pdp13) y 26 (*S. decolorationis* CCTCCM 203093T).

Tabla 13. Análisis SIMPER para determinar la contribución de cada grupo bacteriano a las diferencias totales entre la microbiota intestinal de los ejemplares de *S. senegalensis* que recibieron la dieta Control (Control) y las dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *S. baltica* Pdp13 (Pdp13). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Nº banda DGGE	Identificación	Control-Pdp11	Control-Pdp13	Pdp11-Pdp13
32	Bacteria clon 19	4,53	3,16	0,61
5	<i>Shewanella</i> sp ANA-3	4,17	9,36	6,72
27	<i>Shewanella</i> MJ 5323	13,96	7,65	2,78
30	<i>Shewanella baltica</i> Pdp13	0	17,89	17,10
1	<i>Shewanella baltica</i> R-WP39-25	5,77	2,17	4,84
26	<i>Shewanella decolorationis</i> CCTCCM 203093T	0	14,70	13,99
31	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	0	11,38	10,35
3	<i>Shewanella putrefaciens</i>	4,53	3,43	3,92
16	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	18,49	0,67	12,43
25	<i>Shewanella putrefaciens</i> ZH29	11,69	1,30	5,85
9	<i>Vibrio</i> sp clon 2	4,16	7,02	5,69
23	<i>Vibrio</i> sp SB-E2 g	7,77	2,29	4,81
6	<i>Vibrio alginolyticus</i> CECT 609	10,84	13,25	5,69
20	<i>Vibrio breoganii</i> RD 2B2	7,14	1,79	4,10
19	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	5,63	3,90	1,07

1.4. Estudio histológico de intestino e hígado

Las imágenes obtenidas por medio de la microscopía óptica a partir de las muestras de intestinos e hígado permitieron observar un menor número de inclusiones lipídicas en los enterocitos y hepatocitos de peces alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (43,4% y 24,0% de los campos observados, respectivamente) (Figura 8). Estos valores fueron significativamente superiores ($p < 0,05$) en los intestinos e hígados de peces alimentados con la dieta Control (55,4% y 56,3%, respectivamente) y con la dieta suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp13 (57,1% y 58,0%, respectivamente) (Tabla 14).

Tabla 14. Porcentaje de campos que mostraban las inclusiones lipídicas (IL) presentes en el epitelio intestinal y tejido hepático de los ejemplares de *S. senegalensis* estudiados. Los valores están expresados como la media±desviación estándar. ^aDiferencias significativas ($p<0,05$) con respecto a la dieta Control. ^bDiferencias significativas ($p<0,05$) entre la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 (Pdp13) con respecto a la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11). IL: inclusiones lipídicas.

Localización	Contenido en inclusiones lipídicas (% campos)		
	Control	Pdp11	Pdp13
IL en intestino	55,4 ± 1,1	43,4 ± 0,9 ^a	57,1 ± 1,1 ^b
IL en hígado	56,3 ± 1,1	24,0 ± 3,2 ^a	58,0 ± 0,5 ^b

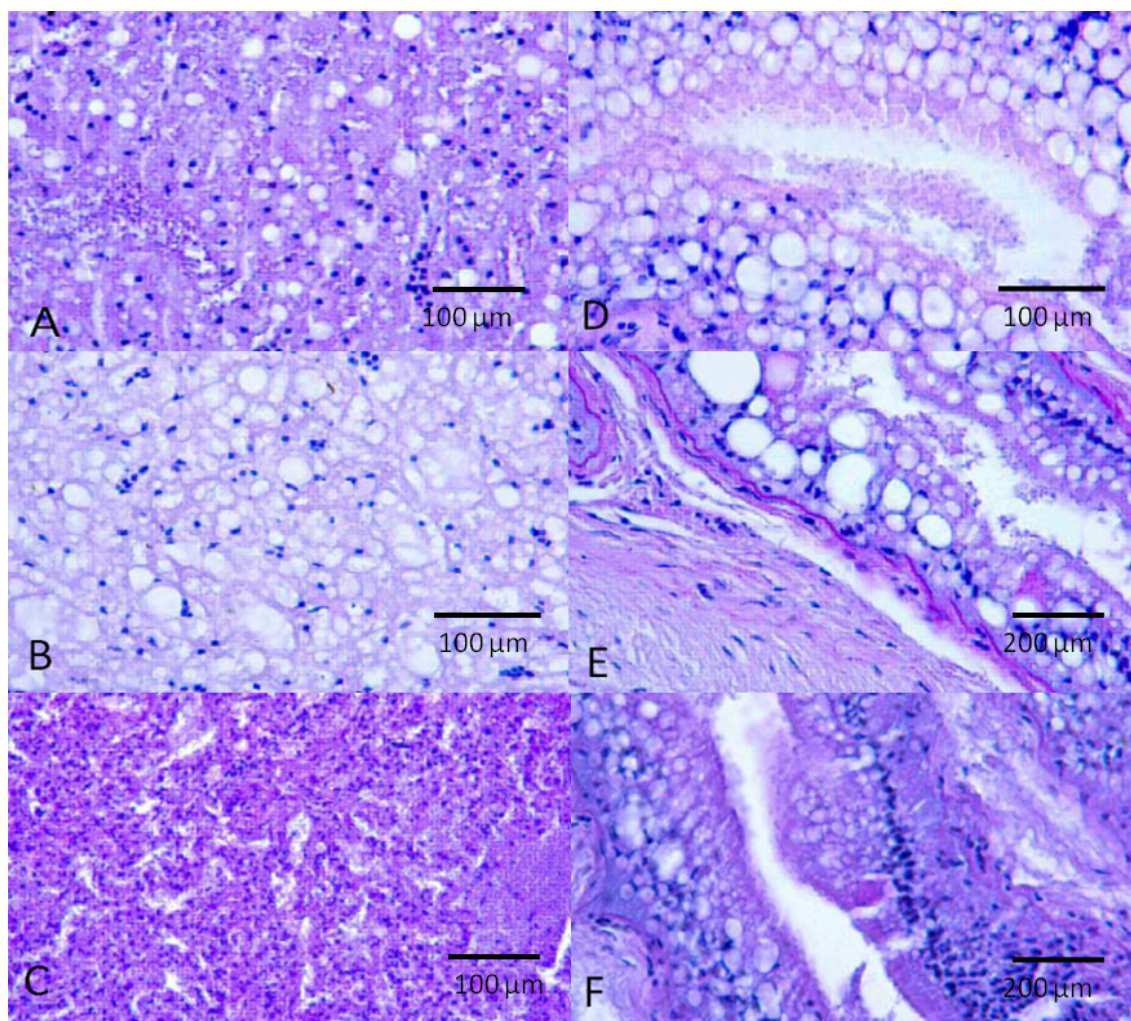


Figura 8. Imágenes al microscopio óptico de cortes histológicos en la que se observan inclusiones lipídicas (400X) en hepatocitos (A, B y C) y enterocitos (D, E, F) de juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta Control (A, D), dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (B, E) y suplementada con *S. baltica* Pdp13 (C, F). Tinción realizada con hematoxilina-eosina y PAS (Ácido Peryódico Schiff).

1.5. Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados del ACP que evaluaron la relación existente entre las diferentes variables se muestran en la Figura 9. Los 2 ejes principales (F1 y F2) absorbieron una varianza total del 93,36%. El eje F1 acumuló el 57,43 % de la varianza, mientras que el segundo contribuyó explicando un 35,93% con respecto a la total. Ambos ejes separaron a los ejemplares del grupo alimentado con *S. putrefaciens* Pdp11 del resto de grupos experimentales (Figura 9B).

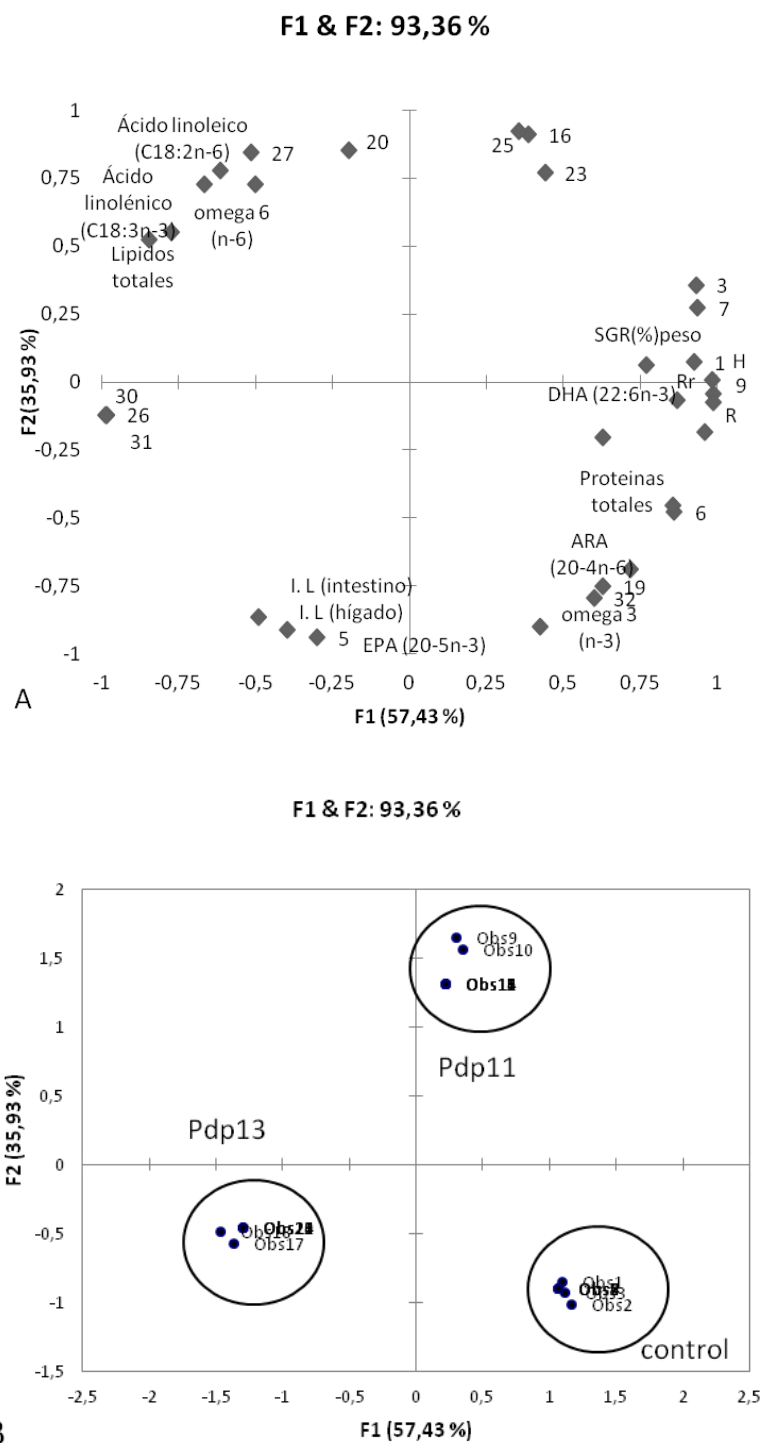


Figura 9. Análisis de Componentes Principales (ACP) aplicado a las medidas obtenidas en el hígado e intestino y la composición de la microbiota intestinal de los peces Control y alimentados con las dietas probióticas (A). Correlación de las variables ensayadas y los factores F1 y F2. SGR: tasa de crecimiento específica; IL: inclusiones lipídicas. Los números se corresponden a las bandas secuenciadas detectadas en los patrones de DGGE. (B) Distribución de los individuos alimentados con la dieta Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) y *S. baltica* Pdp13 (Pdp13) a lo largo de F1 y F2.

Las bandas nombradas como 1, 3, 6, 9, 19 y 32 (*S. baltica*, *S. putrefaciens*, *Vibrio alginolyticus* CECT 609, *Vibrio* sp. no cultivado, *V. penaeicida* DSM14 y una bacteria no identificada pero asociada a mucus de *Oculina patagonica*, respectivamente), junto con los niveles de proteínas y ácidos grasos como ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6) y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) presentaron una correlación positiva ($\geq 75\%$) con el componente F1, mientras que las bandas 26, 27, 30 y 31 (*S. decolorationis* CCTCCM 203093T, *Shewanella* MJ 5323, *S. baltica* y *S. piezotolerans* WP3), los niveles de ácidos grasos omega-6 (n-6), ácido linoleico (18:2n-6), ácido linolenico (18:3n-3) y lípidos mostraron una correlación negativa con este mismo componente, F1. El primer grupo de especies identificadas estuvo presente en peces alimentados con la dieta Control y con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11; en tanto que el segundo grupo lo estuvo en los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13. Por otro lado, la banda número 5 (*Shewanella* ANA), el ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3) y el número de inclusiones lipídicas presentes en los enterocitos y hepatocitos mostraron una correlación negativa con el componente F2, a diferencia de las bandas identificadas como 16, 20, 23 y 25 (*S. putrefaciens* Pdp11, *V. breoganii* RD 2B2, *Vibrio* sp. SB-E2g y *S. putrefaciens* ZH29) que se correlacionaron positivamente con este componente. Este segundo grupo sólo apareció conjuntamente en los patrones de geles de DGGE de los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11. Por último, se pudo comprobar que los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 y aquella suplementada con *S. baltica* Pdp13 se dividieron claramente en dos grupos, situándose en la parte positiva y negativa del eje F2, respectivamente. Los ejemplares tratados con la dieta Control se situaron en la parte negativa del eje F2 y positiva del eje F1 (Figura 9B).

2. Evaluación de la forma de la administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

2.1. Análisis de la microbiota intestinal

A partir del patrón de bandas obtenido en los geles de DGGE de la microbiota intestinal de los lenguados alimentados durante 60 días con las dietas ensayadas se construyó el dendrograma que se muestra en la Figura 10. En él se pueden distinguir 4 agrupaciones que muestran la similitud de la microbiota de ejemplares alimentados con las diferentes dietas ensayadas. La menor similitud entre los patrones de bandas de los geles de DGGE se observó en el caso de los peces alimentados con la dieta Control. Mientras, estos valores oscilaron entre el 40% y el 60% para los peces alimentados con las otras dietas experimentales.

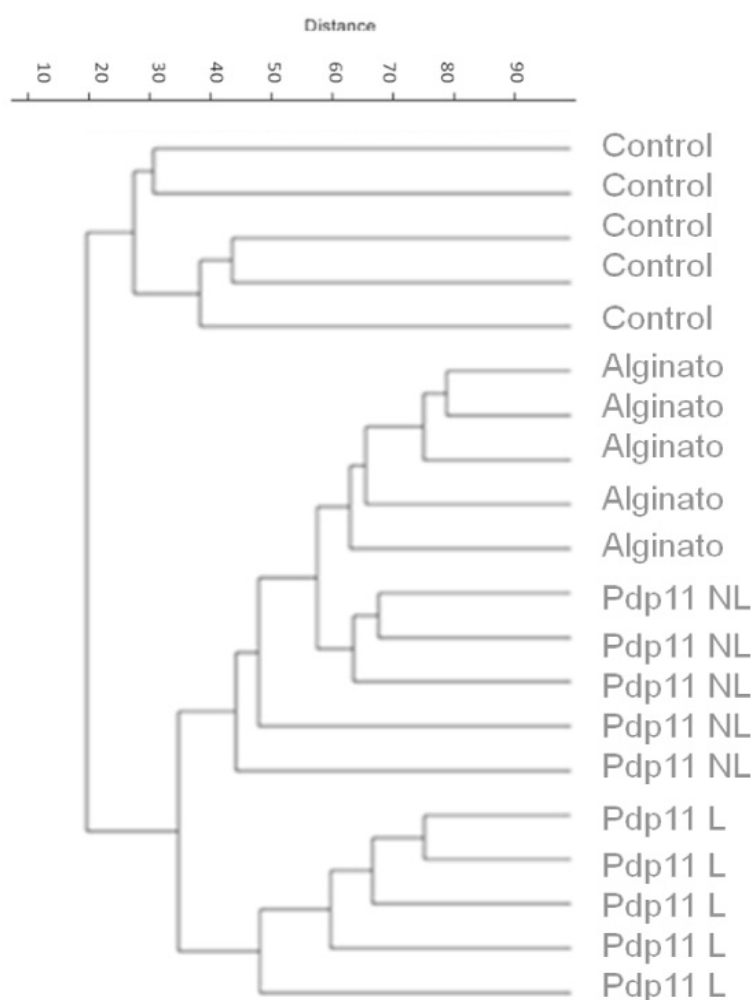


Figura 10. Dendrograma obtenido a partir del análisis de imagen de los geles de DGGE de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados durante 60 días con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta comercial suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L).

Los valores de riqueza (R) y habitabilidad (Rr) obtenidos para los peces alimentados con las 4 dietas experimentales no mostraron diferencias significativas (Tabla 15). Por el contrario, la diversidad calculada mediante el índice de Shannon (H') disminuyó significativamente en los individuos que recibieron las dietas suplementadas con alginato ($2,24 \pm 0,10$), Pdp11 NL ($2,18 \pm 0,07$) y Pdp11 L ($1,80 \pm 0,05$) en comparación con la dieta Control ($2,54 \pm 0,03$) y, correspondiendo los valores mínimos de diversidad a los ejemplares que recibieron la alimentación suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizadas.

Tabla 15. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (Rr) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* tras ser alimentados durante 60 días con dieta comercial (Control); dieta comercial suplementada con alginato (Alginato); dieta suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L). ^aIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la dieta Control; ^bIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la dieta Alginato; ^cIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) con respecto a la dieta Pdp11 NL.

	H'	R	Rr
Control	$2,54 \pm 0,03$	$22,25 \pm 4,96$	$114,34 \pm 51,95$
Alginato	$2,24 \pm 0,10^a$	$18,25 \pm 0,82$	$66,87 \pm 46,11$
Pdp11 NL	$2,18 \pm 0,07^{ab}$	$18,50 \pm 3,04$	$66,75 \pm 5,98$
Pdp11 L	$1,80 \pm 0,05^{abc}$	$19,00 \pm 3,22$	$73,81 \pm 23,63$

Tras recortar y secuenciar el ADN extraído a partir de las bandas de mayor intensidad observadas en los geles de DGGE se obtuvieron las identificaciones que se recogen en la Tabla 16. La mayoría de estas bandas estuvieron relacionadas con el género *Vibrio* y representaron entre el 65,02% y el 91,38% de la intensidad total, siendo *V. harveyi* la especie con porcentajes superiores de intensidad (entre 22,52% y 36,45%). Por otra parte, la presencia de alginato en la dieta parece estar asociada con la ausencia de bandas relacionadas con *Pseudomonas* y ciertas especies de *Vibrio*, como *V. azureus*.

En la microbiota de los ejemplares alimentados con las dos dietas suplementadas con el probiótico (Pdp11 NL y Pdp11 L) no se observaron bandas presentes en el grupo Control, como aquellas relacionadas con *Pseudomonas* sp. VM15C, *Vibrio* sp. S3659 y *V. azureus* LC-005, así como otras bandas detectadas en los lenguados alimentados con la dieta suplementada con alginato como *V. brasiliensis*, *V. alginolyticus* 474. Además, se detectó una banda relacionada con *S. putrefaciens* Pdp11 en todos los individuos alimentados con las dietas Pdp11 NL y L, que no se encontró en el resto de los ejemplares alimentados con las dietas Control y Alginato.

Tabla 16. Identificación de las bandas de los geles de DGGE presentes en más del 50% de los peces de cada grupo, porcentaje de similitud de la secuencia de ADN r 16S con las de la base de datos GenBank, número de acceso y valores medios de la intensidad de las bandas (relativa a la intensidad total de la muestra).. Los valores de desviación típica fueron inferiores al 0,1%. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados durante 60 días con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 no liofilizadas (Pdp11NL) y dieta comercial suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L).

Nº Banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje intensidad (%)		
				Control	Alginato	Pdp11 NL Pdp11 L
γ-Proteobacteria						
20	<i>Enterovibrio nigricans</i>	98	AM942724	0	7,89	12,55
1	<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	97	EF188601	10,92	0	0
26	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	99	JX415533	0	0	10,55
3	<i>Serratia</i> sp. clone SK1Q1u05 no cultivado	97	EU632013	5,88	0	0
9	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	98	DQ416581	5,88	0	0
2	<i>Vibrio</i> sp. S3659	98	FJ457532	11,76	0	0
5	<i>Vibrio</i> sp. S3669	97	FJ457539	11,76	0	21,15
17	<i>Vibrio alginolyticus</i> 474	97	JN188414	0	7,69	0
10	<i>Vibrio azureus</i> LC-005	98	HQ455538	12,88	0	0
6	<i>Vibrio azureus</i> NBRC 104588	98	AB428898	5,88	0	0
16	<i>Vibrio brasiliensis</i>	97	EU834004	0	7,69	0
21	<i>Vibrio fortis</i> CIBAAG8	98	CIBAAG8	0	7,69	10
12	<i>Vibrio fortis</i> LMG21558	97	AJ514917	0	0	18,65
23	<i>Vibrio fortis</i> LMG21566	98	AJ514917	0	7,69	10
15	<i>Vibrio harveyi</i>	97	AB512471	0	7,69	5,55

Tabla 16 (continuación)

Nº Banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje intensidad (%)			
				Control	Alginato	Pdp11 NL	Pdp11 L
γ-Proteobacteria							
22	<i>Vibrio harveyi</i> AM12	97	AB512471	0	7,69	0	0
18	<i>Vibrio harveyi</i> LA08005	99	GQ100186	0	7,69	0	0
8	<i>Vibrio harveyi</i> LA08008	97	GQ180185	5,88	0	0	0
7	<i>Vibrio harveyi</i> XC08001	97	FJ605242	22,82	13,38	22,52	22,21
11	<i>Vibrio marinus</i>	98	GU929925	0	0	0	22,25
14	<i>Vibrio nigrripulchritudo</i>	98	AB297941	0	7,69	12,55	0
13	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> G19	98	KC433745	0	1,1	0	0
19	<i>Vibrio rotiferanus</i>	97	HE584776	0	7,69	0	0
24	<i>Vibrio rotiferanus</i> AP20	99	HE584776	0	7,69	10,55	0
Cianobacteria							
4	<i>Cyanobacterium</i> L08E07 no cultivado	100	AF446263	5,88	0	0	0
Bacterias no identificadas							
25	Bacteria S1cc26	98	DQ416581	0	0	10,55	0

La contribución de los grupos microbianos a las diferencias en la microbiota del intestino de los ejemplares alimentados con las dietas ensayadas se determinó mediante un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) aplicando los valores de intensidad de las bandas obtenidas en la DGGE y secuenciadas (Tabla 17).

Los resultados de este análisis muestran que las diferencias en la microbiota intestinal de lenguados alimentados con las dietas suplementadas con respecto a la microbiota del grupo Control se deben principalmente a especies del género *Vibrio*. *V. harveyi*, *V. fortis*, *V. azureus* y *V. maritimus* fueron las especies que más contribuyeron a la disimilitud entre los patrones de DGGE de los ejemplares que recibieron la dieta Control, respecto a la de los peces que fueron alimentados con las dietas Alginato, Pdp11 NL y Pdp11 L, con valores que oscilaron desde el 5,81% hasta el 16,95%. Se pudo comprobar que el probiótico sin liofilizar y liofilizado contribuyó a la disimilitud de la microbiota intestinal con los peces Control con un 7,14% y un 8,12% en el caso de Pdp11L.

Las diferencias principales entre los grupos alimentados con el pienso suplementado con alginato y el suplementado con *S. putrefaciens* Pdp11 NL se debieron a *V. harveyi* (32,52%) y *S. putrefaciens* Pdp11 (13,38%) mientras que más del 30% de las diferencias encontradas entre el grupo Alginato y Pdp11 L se debieron a *V. fortis* (17,32%), *V. harveyi* (15,15%) y *V. rotiferianus* (11,33%). En este caso, el probiótico sólo tuvo una contribución a la disimilitud total del 6,59%.

En cuanto a los peces alimentados con el probiótico, las diferencias en la microbiota según la forma de administración del probiótico se dieron a nivel de *Vibrio* sp. 3669 (18,55%), a *V. fortis* (16,82%), *V. maritimus* (12,99%) y *V. rotiferianus* (12,33%).

Tabla 17 (pág. siguiente). Análisis SIMPER para determinar la contribución de cada grupo bacteriano a las diferencias de la microbiota de los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con las dietas ensayadas durante 60 días con la dieta comercial (Control), suplementada con alginato (Alginato), suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L). En negrita se muestran contribuciones superiores al 10%.

Nº banda DGGE	Especies	Control- Alginate	Control- Pdp11 NL	Control- Pdp11 L	Alginate- Pdp11NL	Alginate- Pdp11L	Pdp11L -Pdp11L
γ-Proteobacteria							
20	<i>Enterovibrio nigrificans</i>	5,49	7,62	0	5,53	5,27	8,43
1	<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	6,77	7,19	9,79	0	0	0
3	<i>Serratia</i> sp. BSK1Q1u05 no cultivada	4,38	3,59	4,89	0	0	0
26	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	0	7,14	8,12	13,38	6,59	4,45
9	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	3,53	3,75	5,11	0	0	0
2	<i>Vibrio</i> sp. S3659	7,07	7,50	14,92	0	0	0
5	<i>Vibrio</i> sp. S3669	6,92	7,35	9,29	0	15,65	18,55
17	<i>Vibrio alginolyticus</i> 474	4,59	0	0	7,60	5,27	0
6 y 10	<i>Vibrio azureus</i>	10,45	11,09	15,11	0	0	0
16	<i>Vibrio brasiliensis</i>	4,20	0	0	7,11	4,11	7,16
12, 21 y 23	<i>Vibrio fortis</i>	8,70	11,31	8,79	4,63	17,32	16,82
7, 8, 18 y 22	<i>Vibrio harveyi</i>	16,95	9,40	5,81	32,52	15,15	9,03
11	<i>Vibrio maritimus</i>	0	0	13,19	0	10,70	12,99
14	<i>Vibrio nigrripulchritudo</i>	5,54	7,62	0	5,45	5,32	0
13	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> G19	2,18	0	0	3,35	3,18	0
19 y 24	<i>Vibrio rotiferanus</i>	9,40	5,69	0	8,49	11,33	12,33
Cianobacteria							
4	<i>Cyanobacterium</i> FL08E07 no cultivado	3,38	3,59	4,89	0	0	0
Bacterias no identificadas							
25	Bacteria S1cc26	0	7,09	0	11,81	0	9,78

Los resultados obtenidos después de 15 y 30 días tras la suspensión de los tratamientos experimentales con alginato y células de *S. putrefaciens* Pdp11, y el restablecimiento de la alimentación con pienso comercial mostraron que aquellos peces que habían recibido el probiótico, liofilizado o sin liofilizar, tenían unos patrones de bandas de DGGE más similares entre sí que aquellos que habían sido alimentados con las dietas Control y Alginato (Figura 11A y B)

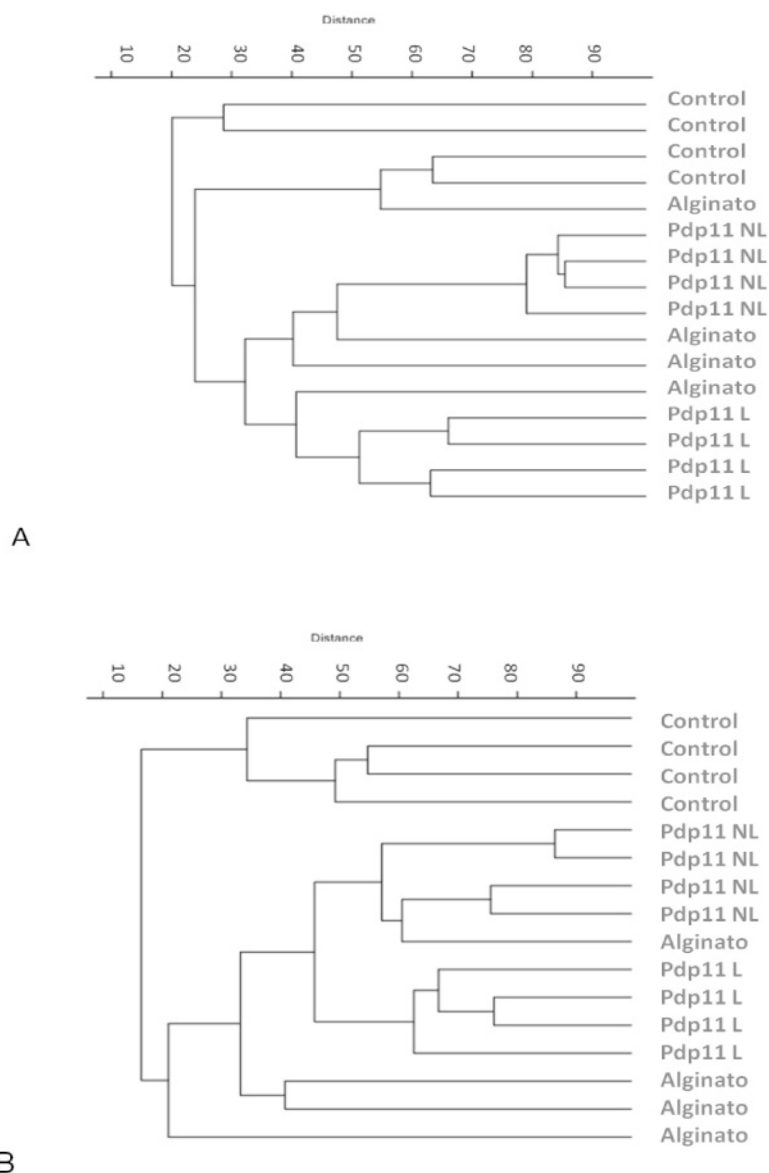


Figura 11. Dendrogramas obtenidos a partir del análisis del patrón de bandas obtenido en gel de DGGE de la microbiota intestinal de individuos de *S. senegalensis* alimentados con las dietas experimentales durante 60 días y posteriormente con dieta comercial durante 15 (A) y 30 (B) días. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta comercial suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L).

En la Tabla 18 se muestran los valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R) y habitabilidad (R_r) calculados a partir de los patrones de bandas de DGGE. Las diferencias en los valores de la riqueza de especies de la microbiota de los ejemplares alimentados con las dietas ensayadas con respecto a la dieta Control no mostraron diferencias significativas. Por otra parte, los valores de diversidad (H') mostrados por los peces que habían recibido alguna de las dietas experimentales fueron significativamente inferiores a los del grupo Control tanto tras los 15 como tras los 30 días de la suspensión de los tratamientos. También en el caso de la habitabilidad (R_r) se observaron diferencias significativas con respecto a la dieta Control sólo a los 30 días de la suspensión de los tratamientos experimentales, si bien en todos los casos fueron superiores a 50.

Tabla 18. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (R_r) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* con dieta comercial (Control) y tras 15 y 30 días de suspender la alimentación con dieta comercial suplementada con alginato (Alginato); dieta suplementada con células no liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L). ^aDiferencias significativas ($p<0,05$) con respecto a la dieta Control

	H'	R	R_r
15 días post-tratamiento			
Control	2,40±0,03	22,00±0,90	121,20±9,80
Alginato	1,58±0,07 ^a	22,40±0,80	125,50±8,82
Pdp11NL	1,52±0,04 ^a	22,20±0,74	123,35±8,25
Pdp11L	1,48±0,03 ^a	22,00±0,63	121,10±6,95
30 días post-tratamiento			
Control	2,44±0,04	23,00±1,09	132,55±12,87
Alginato	1,93±0,08 ^a	20,00±1,67	100,70±16,55 ^a
Pdp11NL	2,09±0,10 ^a	18,80±0,97	88,60±9,30 ^a
Pdp11L	1,70±0,01 ^a	19,80±1,46	98,55±14,32 ^a

Como en los casos anteriores, las bandas de mayor intensidad observadas en los patrones de DGGE se recortaron y se secuenciaron (Tabla 19). Se pudo comprobar que las bandas detectadas más frecuentemente en el intestino de los lenguados de todos los grupos de tratamiento estuvieron relacionadas con el género *Vibrio*. Es interesante destacar la presencia tras 15 días de la suspensión de los tratamientos de una banda con un 99% de similitud con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 tanto en los individuos tratados con las células liofilizadas como no liofilizadas. Por el contrario, a los 30 días desde la suspensión de los tratamientos sólo se detectó esta banda en los patrones de DGGE de los peces que habían recibido la dieta Pdp11 NL. Esta banda no se detectó en ninguno de los peces que recibieron las otras dos dietas ensayadas (Control y Alginato).

Tabla 19. Identificación de las bandas de los geles de DGGE presentes en más del 50% de los peces de cada grupo, porcentaje de similitud de la secuencia de ADNr 16S con las de la base de datos GenBank, número de acceso y valores medios de la intensidad de las bandas (relativa a la intensidad total de la muestra). Los valores de desviación típica fueron inferiores al 0,1%. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados durante 60 días con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta comercial suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L) tras 15 y 30 días de tratamiento probiótico y/o con alginato.

Nº banda DGGE	Identificación	Nº acceso Genbank	Similitud (%)	Porcentaje intensidad (%)			
				Control	Alginato	Pdp11NL	Pdp11 L
15 días post-tratamiento							
	γ-Proteobacteria						
11	<i>Enterovibrio nigricans</i> 8/6b	AM942724	100	0	1,47	2,56	1,51
17	<i>Enterovibrio nigricans</i> DAI 1-1-5	NR_042699	98	0	2,94	5,12	3,02
1	<i>Pseudomonas</i> sp. VM15C	EF188601	99	3,84	0	0	0
3	<i>Serratia</i> sp. BSK1Q1u05 no cultivado	EU632013	97	3,76	0	0	0
18	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	JX415533	97	0	0	2,56	4,54
27	<i>Vibrio</i> sp.	KF577022	97	1,92	2,94	5,12	1,51
24	<i>Vibrio</i> sp. SB-E2 g	AB457052	98	3,84	1,47	0	5,04
9	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	GQ391970	99	5,76	4,41	0	11,08
2	<i>Vibrio</i> sp. S3659	FJ457532	98	7,69	0	0	4,54
5	<i>Vibrio</i> sp. S3669	FJ457539	98	5,76	7,35	0	4,54
10	<i>Vibrio azureus</i> LC-005	HQ455538	100	5,76	2,94	0	6,04
6	<i>Vibrio azureus</i> NBRC 104588	AB428898	97	7,5	5,82	0	3,04
26	<i>Vibrio breoganii</i> CMJ 13.7	EU541610	98	1,92	5,88	2,56	1,51
23	<i>Vibrio breoganii</i> RD 2B2	EU931113	99	4,76	7,76	7,68	4,53
12	<i>Vibrio fortis</i> CIBAAG8	CIBAAG8	99	1,92	5,35	2,56	7,57
20	<i>Vibrio fortis</i> LMG21562	AJ514915	97	5,61	0	5,24	1,51
14	<i>Vibrio fortis</i> LMG21566	AJ514917	99	5,25	5,75	6,36	8,08
7	<i>Vibrio harveyi</i> XC08001	FI605242	98	4,76	5,88	8,35	8,63

Tabla 19 (continuación)

Nº banda DGGE	Identificación	Nº acceso Genbank	Similitud (%)	Porcentaje intensidad (%)			
				Control	Alginate	Pdp11NL	Pdp11 L
15 días post-tratamiento							
γ-Proteobacteria							
13	<i>Vibrio harveyi</i> AM12	AB512471	98	0	4,88	0	5,06
21	<i>Vibrio harveyi</i> AM11	AB512470	97	4,76	4,88	4,12	0
8	<i>Vibrio harveyi</i> LA08008	GQ180185	99	6,28	6,35	8,25	6,25
15	<i>Vibrio rotiferianus</i> AP20	HE584776	98	5,49	3,88	7,5	0
19	<i>Vibrio maritimus</i>	GU929925	97	0	0	5,36	1,51
22	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	AJ421444	99	1,92	5,55	5,6	0
25	<i>Vibrio penaeicida</i> NBRC15642	AB680928	99	3,8	4,41	7,68	3,02
Cianobacteria							
4	<i>Cyanobacterium</i> FL08E07 no cultivado	AF446263	99	3,84	4,41	0	0
Bacterias no identificadas							
29	<i>Bacteria</i> YC1_B08 no cultivado	KC631515	98	1,92	2,94	3,56	2,25
28	<i>Bacteria</i> YZ05 no cultivado	KJ457330	97	1,92	1,47	3,56	1,51
16	<i>Bacteria</i> S1cc26	DQ416581	99	0	0	5,55	3,15
30 días-post tratamiento							
2	<i>Acinetobacter</i> MBL-0202	HM366451	99	0	0	1,85	2,17
45	<i>Aliivibrio</i> sp. C 17.13	EU541616	99	0	0	1,85	2,17
43	<i>Aliivibrio</i> sp. HM6-17	AB525421	100	0	0	1,85	2,17
36	<i>Enterovibrio nigrificans</i> 6/8b	AM942724	97	0	2,5	1,85	2,17
40	<i>Enterovibrio nigrificans</i> DAI 1-1-5	NR_042699	99	1,88	2,5	0	0
53	<i>Photobacterium</i> pRDA19	AJ749800	99	3,77	2,5	0	0
51	<i>Shewanella</i> ANA	CP000469	100	0	0	4	4,34

Tabla 19 (continuación)

Nº banda DGGE	Identificación	Nº acceso Genbank	Similitud (%)	Porcentaje intensidad (%)			
				Control	Alginate	Pdp11NL	Pdp11 L
30 días post-tratamiento							
50	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	JX415533	98	0	0	7,4	0
49	<i>Vibrio</i> sp. 2 no cultivado	AY785249	100	3,77	2,5	1,85	2,17
47	<i>Vibrio</i> sp. HA_62 no cultivado	KF859601	98	5,65	5	3,7	4,34
44	<i>Vibrio</i> sp. BFLP-10	FN687911	98	7,53	0	0	0
34	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	GQ391970	98	1,88	7,5	7,4	2,17
30	<i>Vibrio</i> sp. S3669	FJ457539	99	11,29	12,5	7,4	15,21
35	<i>Vibrio azureus</i> LC-005	HQ455538	97	0	12,5	7,4	6,51
31	<i>Vibrio azureus</i> NBRC 104588	AB428898	99	13,17	10	11,1	15,21
48	<i>Vibrio breoganii</i> RD 2B2	EU931113	99	3,77	5	0	7,02
54	<i>Vibrio cambelii</i>	KC534349	98	1,88	4	0	0
38	<i>Vibrio harveyi</i> AM12	AB512471	98	0	0	7,4	10,85
33	<i>Vibrio harveyi</i> LA08008	GQ180185	99	7,53	10	9,25	2,17
32	<i>Vibrio harveyi</i> XC08001	FJ605242	100	5,65	5	5,55	6,51
37	<i>Vibrio fortis</i> CIBAAG8	CIBAAG8	97	1,88	5	0	0
20	<i>Vibrio fortis</i> LMG21558	AJ514913	98	1,88	1	1,45	2,5
39	<i>Vibrio fortis</i> LMG21566	AJ514917	99	4,41	2,5	0	0
19	<i>Vibrio maritimus</i>	NR_117551	98	1,88	0	0	2,5
54	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14398T	AJ421444	99	0	1	3,55	1
41	<i>Vibrio rotiferanus</i> AP20	HE584776	98	9,41	5	7,5	0
Bacterias no identificadas							
46	Bacteria no cultivada Op7_2111	FJ933896	99	5,65	4	3,7	4,34
42	Bacteria S cc26	DO416581	99	5,65	0	3,7	4,34

Para determinar la contribución de las especies identificadas a partir de las bandas de DGGE a los 15 y 30 días después de la suspensión de los tratamientos experimentales a las diferencias en la microbiota intestinal se realizó el análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) (Tabla 20). Tras el análisis se pudo observar que, en general, las diferencias entre los patrones de bandas de los grupos analizados se debieron en mayor medida a las especies del género *Vibrio*, a las que se atribuyó entre el 17,75% y 89,83% de las diferencias a 15 días después del tratamiento y entre 29,48% y 75,96% tras 30 días después de la suspensión del mismo.

Al analizar las especies del género *Vibrio* responsables de las diferencias descritas, se observó que tras 15 días desde la suspensión de los tratamientos, bandas relacionadas con *V. harveyi*, *V. azureus*, *V. penaeicida* y *V. fortis* mostraron contribuciones superiores al 10% a la disimilitud entre los patrones de DGGE de los peces que habían recibido cualquiera de los tres tratamientos experimentales respecto a los peces del grupo Control (Tabla 21).

Nuevamente, después de 30 días desde la suspensión del tratamiento, las mayores contribuciones a la disimilitud de los patrones de bandas de DGGE entre los peces que habían recibido los distintos tratamientos experimentales se debieron a bandas relacionadas con *V. harveyi*, *V. azureus* y *V. fortis*. Cuando esta comparación se hizo entre los patrones de DGGE de los peces que se alimentaron con las dietas Alginato y probióticos, estas mismas especies, además de *V. maritimus* (13%), tuvieron las mayores contribuciones a la disimilitud entre los patrones de DGGE (Tabla 21).

Por otro lado, las diferencias en los patrones de bandas de los peces alimentados con el probiótico liofilizado con respecto a los que se alimentaron con el probiótico sin liofilizar, se debieron a ciertas especies del género *Shewanella* (33,60%), y a especies pertenecientes al género *Vibrio*, como *V. harveyi*, *V. azureus*, *V. fortis*, *V. maritimus* y *V. penaeicida* (Tabla 21).

Tabla 20. Análisis SIMPER para determinar la contribución de cada grupo bacteriano a la disimilitud total de la microbiota de *S. senegalensis* tras 15 y 30 días desde la suspensión de la alimentación con las dietas experimentales. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células no liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11NL) y dieta comercial suplementada con células liofilizadas de *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11L). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Grupos bacterianos	Control- Alginato	Control- Pdp11NL	Control- Pdp11L	Alginato- Pdp11NL	Alginato- Pdp11L	Pdp11 NL - Pdp11L
Día 15 post-tratamiento						
Cianobacterias no cultivadas	5,26	10,39	7,85	10,71	22,43	0
Pseudomonas	9,91	10,39	7,85	0	0	0
Serratia no cultivada	15,17	15,96	12,01	0	0	0
Shewanella	0	5,12	12,01	3,45	22,43	10,17
Vibrio	61,25	36,76	44,21	67,98	17,75	89,83
Bacterias no identificadas	8,40	21,36	16,07	17,85	37,39	0
Día 30 post-tratamiento						
Shewanella	0	38,28	35,10	42,81	32,64	33,60
Vibrio	75,96	39,89	46,97	29,48	45,01	41,27
Bacterias no identificadas	24,04	11,84	17,84	27,72	22,35	25,12

Tabla 21 (pág. siguiente). Análisis SIMPER para determinar la contribución de las especies del género *Vibrio* a las diferencias de la microbiota de *S. senegalensis* tras 15 y 30 días después de la suspensión de la alimentación con las dietas experimentales. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con alginato (Alginato), dieta comercial suplementada con células de *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizadas o no (Pdp11NL y Pdp11L, respectivamente). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Nº banda DGGE	Especie	Control- Alginato	Control- PdP11 NL	Control- PdP11 L	Alginato- PdP11 NL	Alginato- PdP11 L	PdP11 NL- PdP11 L
15 días post tratamiento							
27	<i>Vibrio</i> sp.	3,06	3,62	1,79	2,28	2,78	2,95
24	<i>Vibrio</i> sp. SB-E2 g	3,08	4,33	3,7	1,68	4,31	6,05
9	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	3,67	6,57	8,9	5,09	7,06	11,93
2	<i>Vibrio</i> sp. S3659	6	6,51	4,1	0	4,35	4,63
5	<i>Vibrio</i> sp. S3669	7,4	6,57	3,6	8,41	5,64	4,26
6 y 10	<i>Vibrio azureus</i>	10,62	12,99	10,62	10,19	10,19	5,69
23 y 26	<i>Vibrio breoganii</i>	15,17	7,4	7,08	12,39	8,92	3,43
7, 8, 13 y 21	<i>Vibrio harveyi</i> LA08008	17,3	15,3	30,30	18,65	26,26	28,10
12, 14 y 20	<i>Vibrio fortis</i> LMG21566	18,21	11,07	12,20	18,65	14,04	10,52
19	<i>Vibrio maritimus</i>	0	10,15	1,69	10,20	1,35	7,47
22 y 25	<i>Vibrio penaeicida</i>	12,37	11,67	10,5	10,15	8,02	7,46
15	<i>Vibrio rotiferanus</i> AP20	3,08	3,65	5,09	2,24	7,02	7,44
30 días post tratamiento							
34	<i>Vibrio</i> sp. PaH3.36c2	5,4	7,81	8,17	13,69	11,05	0
44	<i>Vibrio</i> sp. BFLP-10	6,19	5,32	4,74	5,39	6,19	7,35
30	<i>Vibrio</i> sp. S3669	6,26	5	2,76	4,69	5,62	4,45
31 y 35	<i>Vibrio azureus</i>	9,59	13,73	14,33	13,09	10,59	11,49
48	<i>Vibrio breoganii</i> RD 2B2	7,4	5,25	6,45	6,75	5,25	0
20, 37 y 39	<i>Vibrio fortis</i>	23,98	17,03	21,88	28,26	22,86	21,24
41	<i>Vibrio rotiferanus</i> AP20	8,11	7,81	8,17	0	0	0
32, 33 y 38	<i>Vibrio harveyi</i>	17,16	22,43	19,28	20,88	17,79	22,88
19	<i>Vibrio maritimus</i>	10,21	9,83	5,15	0	13,01	17,26
54	<i>Vibrio penaeicida</i>	5,53	5,03	8,17	6,77	7,32	14,82

3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de *Solea senegalensis* tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11

3.1. Análisis de la microbiota intestinal

El análisis de la microbiota intestinal a partir de los patrones de bandas de DGGE permitió generar un dendrograma en el que se observan agrupaciones claramente definidas en función del tratamiento recibido (Figura 12). Los ejemplares tratados con OTC quedaron incluidos en un mismo grupo con un porcentaje de similitud cercana al 40% mientras que los del grupo Control presentaron una similitud entorno al 50%. Por otro lado, el grupo OTC+Pdp11 mostró una similitud del 55% entre sus ejemplares.

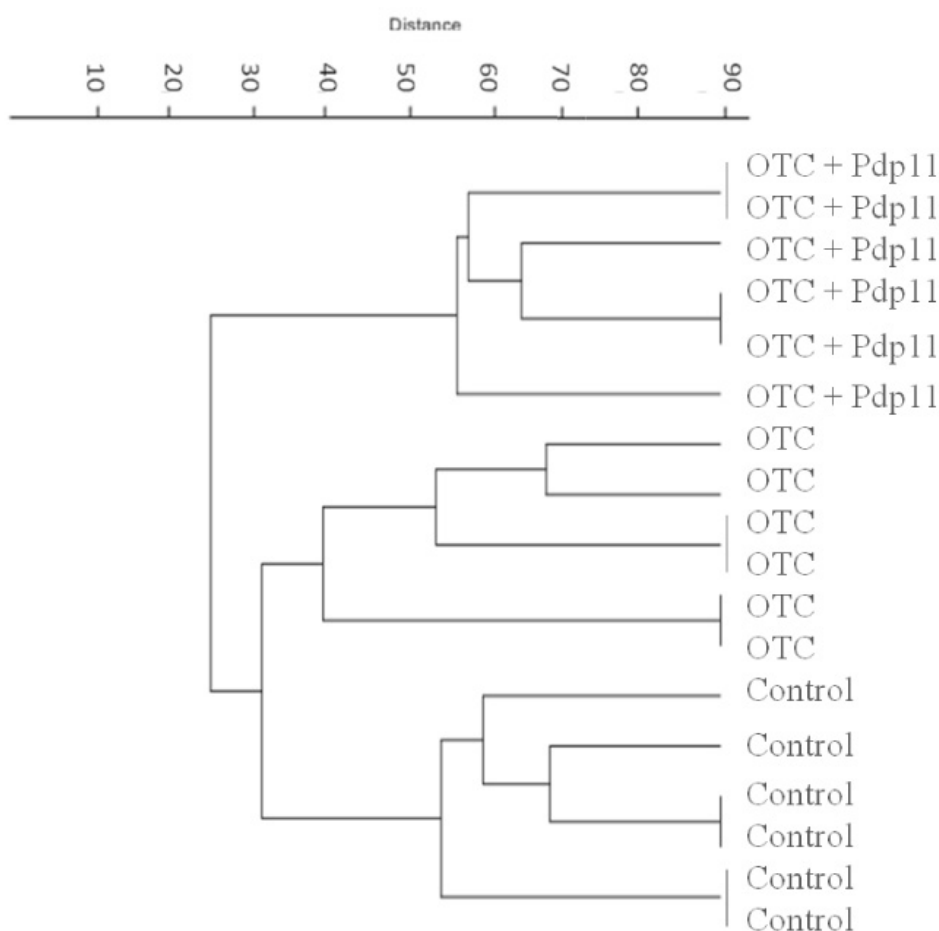


Figura 12. Dendrograma obtenido a partir del análisis de imagen de las bandas del gel de DGGE de la microbiota intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* tratados con una dieta comercial (Control); tratados durante 10 días con la dieta comercial suplementada con oxitetraciclina (OTC); y ejemplares tratados con una dieta comercial con oxitetraciclina y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11).

Los valores obtenidos en los índices ecológicos calculados se resumen en la Tabla 22. Como se puede observar los ejemplares que recibieron la dieta suplementada con OTC mostraron una reducción significativa en todos los parámetros evaluados en la microbiota respecto a los peces del grupo Control; en tanto que los individuos tratados conjuntamente con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 mostraron incrementos significativos de estos mismos parámetros respecto a los ejemplares Control y a los que recibieron el antibiótico (OTC).

Tabla 22. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (R_r) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados durante 10 días con dieta comercial (Control), una dieta comercial suplementada con OTC (OTC) y una dieta comercial con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11). ^aIndica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto a la dieta Control. ^bIndica diferencias significativas ($p<0,05$) con respecto al tratamiento OTC.

Tratamiento	H'	R	R_r
Control	2,36±0,04	15,20±2,00	35,22±3,00
OTC	1,85±0,23 ^a	7,50±1,11 ^a	7,79±2,55 ^a
OTC+Pdp11	3,17±0,15 ^{ab}	27,75±3,77 ^{ab}	158,20±41,99 ^{ab}

La identificación de las secuencias de las bandas predominantes observadas en los geles de DGGE así como los valores de intensidad de las mismas se muestran en la Tabla 23. Las secuencias obtenidas en los tres tratamientos pertenecieron principalmente a especies del grupo de γ -Proteobacterias, representando entre el 63,30% y 94,23% de la intensidad total de las bandas. El tratamiento OTC+Pdp11 indujo una mayor diversidad filogenética de la microbiota intestinal, detectándose grupos tales como Mollicutes, Firmicutes, Actinobacterias y Acidobacterias, los cuales no se detectaron en los patrones de bandas de DGGE de otros tratamientos. Por otro lado, la administración de OTC indujo la presencia de bandas relacionadas con *Allivibrio fisheri*, las cuales no se detectaron en la microbiota intestinal de peces Control ni aquellos tratados con OTC+Pdp11. Este último tratamiento indujo la presencia de bandas en los patrones de DGGE relacionadas con microorganismos tales como *Acinetobacter johnsoni* y clones del género *Shewanella* y *Pseudomonas*, mientras que se encontró una disminución significativa del porcentaje de intensidad correspondiente a las bandas relacionadas con el género *Vibrio*. El grupo relacionado con los Firmicutes, que sólo se detectó en estos ejemplares, representó un 8% de la intensidad total de las bandas del patrón de DGGE. Estas bandas fueron relacionadas con *Bacillus aquimaris*, *Candidatus* Arthromitus y *Lactobacillus fermentum*.

Tabla 23. Identificación de las bandas de los geles de DGGE presentes en más del 50% de los peces de cada grupo, porcentaje de similitud de la secuencia de ADN_r 16S con las de la base de datos GenBank, número de acceso y valores medios de la intensidad de las bandas (relativa a la intensidad total de la muestra). Los valores de desviación típica fueron inferiores a 0,1%. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con OTC (OTC) y dieta comercial con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11).

Nº banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje intensidad (%)		
				Control	OTC	OTC + Pdp11
γ-Proteobacteria						
56	<i>Acinetobacter johnsonii</i> MA19	100	DQ864703	0	0	3,73
23	<i>Aliivibrio fischeri</i> OT162	100	AB239367	0	8,56	0
22	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	98	AB049728	8,06	9,87	1,40
19	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. OC-2	99	AY669164	4,72	0	0
59	<i>Pseudoalteromonas aliena</i> KMM 3562	99	NR_025775	0	0	3,97
29	<i>Pseudomonas</i> GD	99	EU233276	0	10,70	0
52	<i>Pseudomonas acephalitica</i> Ind01	100	AM407893	0	0	2,90
60	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	100	AJ308303	0	0	4,73
61	<i>Pseudomonas</i> sp.	99	DQ219370	0	0	4,27
32	<i>Shewanella</i> MJ 5323	97	DQ531951	0	0	3,28
36	<i>Vibrio alginolyticus</i> GCSL 29	100	DQ497399	0	0	3,28
1	<i>Vibrio harveyi</i> N8	99	DQ166244	6,69	14,22	0
55	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	98	FJ605242	0	0	3,73
3	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SF11070701B	99	KC884596	7,60	17,65	0
24	<i>Vibrio ichthyenteri</i> H5	99	JQ904784	6,24	0	0
12	<i>Vibrio ichthyenteri</i> HQ010223	99	DQ003270	0	0	2,10
28	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SMP2	99	KC884640	5,24	0	0
31	<i>Vibrio ichthyenteri</i> X32	99	KC884634	0	0	2
26	<i>Vibrio inusitatus</i> W21	97	DQ922921	0	0	1,50
25	<i>Vibrio natriegens</i>	98	FM999825	0	0	1,50
50	<i>Vibrio natriegens</i> C170	98	AB719184	0	0	3,01
4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M2-31	98	KC210810	10,09	16,10	0
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> XG409	100	JQ948037	5,23	0	2,34
35	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	99	AJ421444	0	0	3,79
13	<i>Vibrio scopthalmi</i> D725	99	JF836195	5,24	0	3,20
18	<i>Vibrio splendidus</i>	99	AY620972	6,39	11,34	3,20
49	<i>Vibrio</i> sp. B2-6	99	JX134442	0	0	2,34
54	<i>Vibrio</i> sp SB-E2 g	100	AB457052	0	0	3,51

Tabla 23 (continuación)

Nº banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje intensidad (%)		
				Control	OTC	OTC + Pdp11
γ-Proteobacteria (cont.)						
8	<i>Vibrio</i> sp. P-F2	97	HQ897566	4,72	5,89	0
14	<i>Vibrionaceae</i> PH5	99	AF513466	9,92	0	3,73
33	<i>Vibrionaceae</i> P_C5	100	FJ178091	0	0	1,79
Acidobacteria						
34	<i>Acidobacterium</i> no cultivada	100	FM206243	0	0	2,78
Actinobacteria						
27	<i>Actinobacterium</i> SC3-RK190 no cultivada	98	FM206234	0	0	2,00
58	<i>Brevibacterium salitolerans</i> TRM 415	98	GU117109	0	0	3,24
Firmicutes						
46	<i>Candidatus</i> Arthromitus sp. SFB-rat-Yit	100	DQ857141	0	0	2,34
57	<i>Bacillus aquimaris</i>	99	AB262736	0	0	3,88
30	<i>Lactobacillus fermentum</i> 3F9	98	AM117178	0	0	2
Mollicutes						
47	<i>Mycoplasma iowae</i> 695 ATCC 33552	99	JN935877	0	0	2,06
16	<i>Mycoplasma</i> sp. C10 no cultivada	100	DQ340196	0	0	3,20
Bacterias no identificadas						
9	Bacteria no cultivada NT4_C27	100	HM630215	8,06	5,89	0
10	Bacteria no cultivada YO00334E05	100	FJ835362	3,55	0	0
17	Bacteria no cultivada RMAM1304	98	HQ320228	3,07	0	0
37	Bacteria no cultivada BR01AH03	99	DQ857155	0	0	3,79
44	Bacteria no cultivada BR01AD06	97	DQ857141	0	0	3,79
48	Bacteria no cultivada abc29f08x1	99	JX134442	0	0	2,34
51	Bacteria no cultivada EXO15432	97	FM242723	5,60	0	2,73

Para determinar la contribución de las distintas bandas a la disimilitud entre los patrones de bandas de la microbiota intestinal de los lenguados tratados, se realizó un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) aplicando los valores de intensidad de las bandas secuenciadas resumiéndose los resultados en la Tabla 24. γ -Proteobacteria y el grupo de bacterias no identificadas fueron responsables del total de las diferencias entre los grupos Control y OTC. Por el contrario, estas diferencias estuvieron más repartidas cuando la comparación se llevó a cabo entre los peces del grupo Control, OTC y OTC+Pdp11. En este caso, si bien los grupos bacterianos antes nombrados aportaron alrededor del 25% de las diferencias, grupos tales como Mollicutes, Actinobacterias y Firmicutes contribuyeron con valores de disimilitud superiores al 10%, si bien el grupo de γ -Proteobacterias contribuyó en mayor medida que los otros grupos, así cuando se comparan los patrones de los grupos OTC y OTC y Pdp11 prácticamente el 48,38% de la disimilitud se debió al grupo de γ -Proteobacterias (Tabla 24).

Tabla 24. Análisis SIMPER para identificar la contribución de cada grupo bacteriano en la disimilitud total de la microbiota de *S. senegalensis* alimentados con dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con OTC (OTC) y dieta comercial con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Grupos bacterianos	Control-OTC	Control-OTC+Pdp11	OTC-OTC+Pdp11
γ -Proteobacteria	49,19	24,88	48,38
Acidobacterias	0	7,41	7,45
Actinobacterias	0	11,34	11,39
Firmicutes	0	17,12	17,20
Mollicutes	0	11,35	11,41
Bacterias no identificadas	50,81	27,89	4,16

En la tabla 25 se desglosa la disimilitud aportada por los diferentes grupos de γ -Proteobacterias a las diferencias en la microbiota observada entre los peces tratados. Cabe destacar el porcentaje de disimilitud aportado por las especies *Pseudomonas acephalitica*, *Aliivibrio fischeri*, *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi* al comparar los patrones de los peces tratados con OTC en comparación con los controles. Estas dos últimas especies fueron también las que mayor contribución tuvieron cuando se compararon los ejemplares tratados con OTC y aquellos donde la OTC se suministra junto con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11.

Si bien las bandas relacionadas con estas tres especies de *Vibrio* se detectaron en los ejemplares de todos los tratamientos, fue en aquellos que recibieron el tratamiento conjunto de OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 en los que estas bandas nunca mostraron valores medios de intensidad superiores al 2,5% (Tabla 22)

Tabla 25. Análisis SIMPER para determinar la contribución de miembros de γ -Proteobacteria a la diferencia de la microbiota de *S. senegalensis* alimentados con dieta comercial (Control), dieta comercial suplementada con OTC (OTC) y con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Nº banda DGGE	Especies	Control-OTC	Control-OTC+Pdp11	OTC-OTC+Pdp11
	<i>Acinetobacter johnsonii</i> MA19	0	1,31	1,19
23	<i>Allivibrio fischeri</i> OT162	12,53	0	6,52
19	<i>Pseudoalteromonas</i> sp. OC-2	6,69	4,46	0
52	<i>Pseudomonas acephalitica</i> ind01	14,77	0	7,69
61	<i>Pseudomonas</i> sp.	0	3,51	3,19
29	<i>Pseudomonas</i> GD	0	2,70	2,10
60	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0	3,81	4,19
59	<i>Pseudoalteromonas aliena</i> KMM	0	3,63	2,83
22	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	3,10	5,96	6,27
32	<i>Shewanella</i> MJ 5323	0	2,81	2,19
49	<i>Vibrio</i> sp. B2-6	0	2,07	1,62
8	<i>Vibrio</i> sp. P-F2	1,84	4,17	4,23
54	<i>Vibrio</i> sp. SB-E2 g	0	3,16	2,46
36	<i>Vibrio alginolyticus</i> GSCL29	0	2,81	2,19
55	<i>Vibrio harveyi</i> CXO8001	0	3,71	2,89
1	<i>Vibrio harveyi</i> N8	10,25	6,58	10,48
24	<i>Vibrio ichthyenteri</i> H5	6,12	5,53	0
12	<i>Vibrio ichthyenteri</i> HQ010223	0	1,85	1,44
3	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SF11070701B	2,74	4,79	7,01
28	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SMP2	2,17	2,13	0
31	<i>Vibrio ichthyenteri</i> X32	0	0,55	0,25
26	<i>Vibrio inusitatus</i> W21	0	1,06	0,82
25	<i>Vibrio natriegens</i>	0	0,75	0,59
50	<i>Vibrio natriegens</i> C170	0	2,73	2,13
4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M2-31	5,01	9,43	9,97
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> XG409	6,92	1,79	2,20
35	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	0	1,60	1,25
13	<i>Vibrio scophthalmi</i> D725	4,37	6,77	4,08
18	<i>Vibrio splendidus</i>	7,48	2,48	5,83
33	Vibrionaceae P_C5	13,83	5,98	2,53
14	Vibrionaceae PH5	2,10	1,75	1,10

3.2. Estudio de la expresión génica

Todos los programas utilizados para el análisis de los genes de referencia determinaron los genes UBQ y GADPH1 como los más estables y adecuados para los cálculos posteriores. De acuerdo con *ReffFinder*, herramienta desarrollada para evaluar la estabilidad de los genes establecidos como de referencia, éstos quedaron de la siguiente forma: UBQ > GADPH1 >

ACTB2 > GADPH2 > ACTB1 > ADNr 18S (Figura 13). Por ello, se eligieron los dos primeros (UBQ y GADPH1) como genes de referencia.

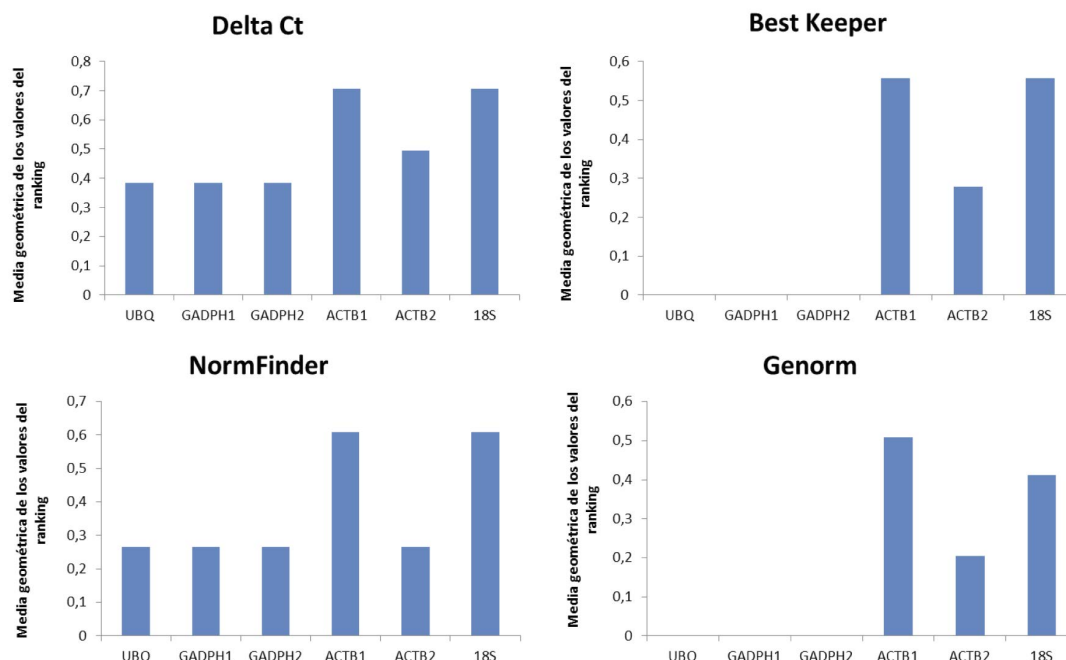


Figura 13. Estabilidad génica de los genes a emplear como referencia en las muestras de ejemplares de *S. senegalensis* tratados con una dieta comercial (Control); tratados durante 10 días con la dieta comercial suplementada con oxitetraciclina (OTC); y ejemplares tratados durante 10 días con una dieta comercial con oxitetraciclina y *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC + Pdp11) analizada mediante cuatro programas diferentes: Delta CT, Bestkeeper, NormFinder y, Genorm medida por el método de la media geométrica. Valores más bajos representan una expresión más estable.

Los valores relativos de transcritos de los genes analizados en el hígado de los grupos de peces tratados con OTC y con OTC junto al probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 relativizados al grupo Control pueden observarse en la Figura 14. Las muestras de hígado pertenecientes a los individuos tratados sólo con el antibiótico (OTC) mostraron incrementos relativos significativos en los niveles de transcripción génica de CASPASE6, NADPHox, TF, HAMP1, IGF- β y GP96. Por otro lado, excepto para CASPASE6 que mostró una transcripción significativamente menor respecto al Control, los peces tratados con OTC junto al probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, también mostraron un incremento de la transcripción de los genes previamente mencionados; sin embargo, el incremento registrado en los peces del grupo OTC+Pdp11 fue significativamente menor en los genes TF y NADPHox y significativamente mayor para los genes HAMP1, GP96 y IGF- β que los detectados en el grupo OTC. Además, los peces del grupo OTC+Pdp11 mostraron un incremento significativo en la transcripción de los genes HSP70, NKEF y GPx.

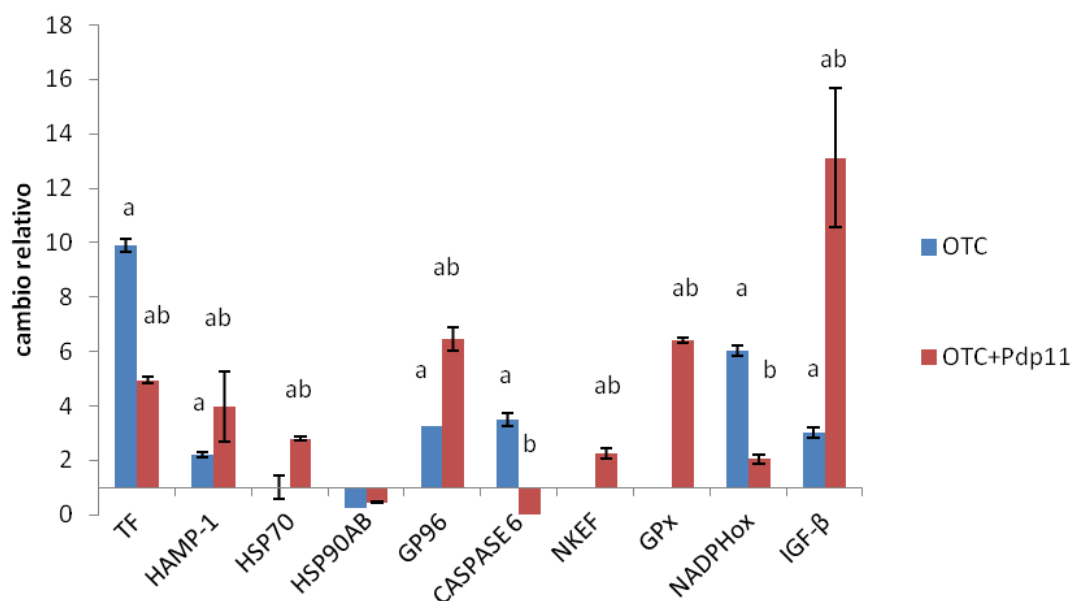


Figura 14. Valores de transcripción relativa de los genes TF, HAMP1, HSP70, HSP90AB, GP96, CASPASE6, NKEF, GPx, NADPHox y IGF-β en el hígado de *S. senegalensis* tratados durante 10 días con OTC y OTC+Pdp11. Los datos están expresados en media±desviación típica con respecto al grupo Control. ^a representa diferencias estadísticamente significativas con respecto al grupo Control ($p<0,05$); ^b indica diferencias estadísticamente significativas del grupo OTC + Pdp11 con respecto al grupo OTC.

3.3. Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados del ACP evaluaron las relaciones entre las especies detectadas en la microbiota intestinal y la expresión génica del hígado de los juveniles del lenguado senegalés sometidos a los tres tratamientos ensayados y representados en la Figura 15. Los dos componentes principales (F1 y F2) sumaron el 75,51% de la variabilidad de los datos. El eje F1 acumula el 61,42% de la variabilidad y está relacionado con la presencia o ausencia del probiótico en el tratamiento, ya que los individuos, que no lo recibieron (Control y OTC), están situados en los extremos de dicho eje. En F1 también se detectó una correlación positiva ($\geq 75\%$) con las bandas presentes solamente en el patrón de DGGE de los peces tratados con OTC +Pdp11 y la expresión de los genes NKEF, IGF-β, HAMP1, HSP70 y GP96. Por el contrario, las bandas secuenciadas pertenecientes a la microbiota intestinal de los peces tratados con OTC (bandas 1, 3, 4, 8, 9) y transcripción de los genes CASPASE6 y NADPHox correlacionaron negativamente con el componente F1 (Figura 15A). Además, se detectó en los individuos Control una relación estrecha entre microorganismos de la microbiota intestinal (6, 10, 14, 17, 19 y 24) y la transcripción del gen HSP90AB sólo en los individuos Control (Figura 15A).

En resumen, los peces Control así como los tratados con OTC se separaron en grupos diferentes: los individuos del grupo Control y OTC se situaron en el eje negativo y los tratados con OTC + Pdp11 se situaron en el eje positivo del eje F1 (Figura 15B).

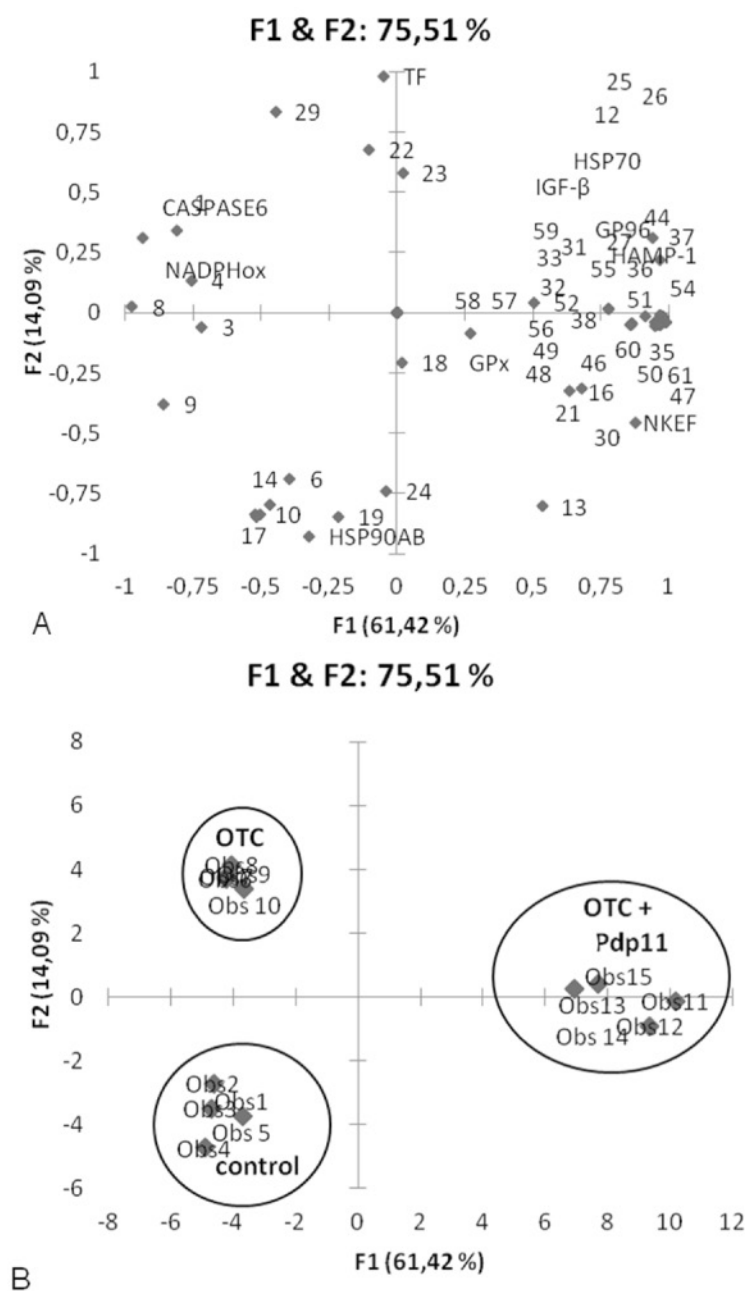


Figura 15. Análisis de Componentes Principales (ACP) aplicado a los datos de transcripción génica en hígado, y la composición de la microbiota intestinal de los peces Control y tratados durante 10 días con OTC (OTC) y OTC junto con *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC + Pdp11). (A) Correlación de las variables a lo largo de los componentes. Los números se corresponden a las bandas secuenciadas detectadas en los patrones de DGGE. (B) Distribución de los individuos de *S. senegalensis* alimentados con la dieta Control y tratada con OTC y OTC junto con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 a lo largo del F1 y F2.

4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de *Solea senegalensis* sometidos a estrés

4.1. Infección bacteriana

Una semana después del comienzo del experimento aparecieron síntomas de enfermedad en los individuos cultivados a densidad elevada tanto del grupo CHD, como del grupo PHD. Estos síntomas consistieron en un oscurecimiento de la piel, así como la aparición de úlceras en la superficie de la misma (Figura 16).



Figura 16. Ejemplar de *S. senegalensis* afectado por una infección causada por las especies *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*.

Posteriormente, entre el octavo y el noveno día del inicio del ensayo se observó mortalidad en los grupos de individuos sometidos a alta densidad poblacional alcanzándose a los 30 días niveles entre un 40 y un 80%, en función del tanque. A los 30 días se alcanzaron valores de mortalidad entre el 50-80% grupo CHD. Sin embargo, la mortalidad no fue superior al 5% en el caso de los ejemplares del grupo PHD (Figura 17).

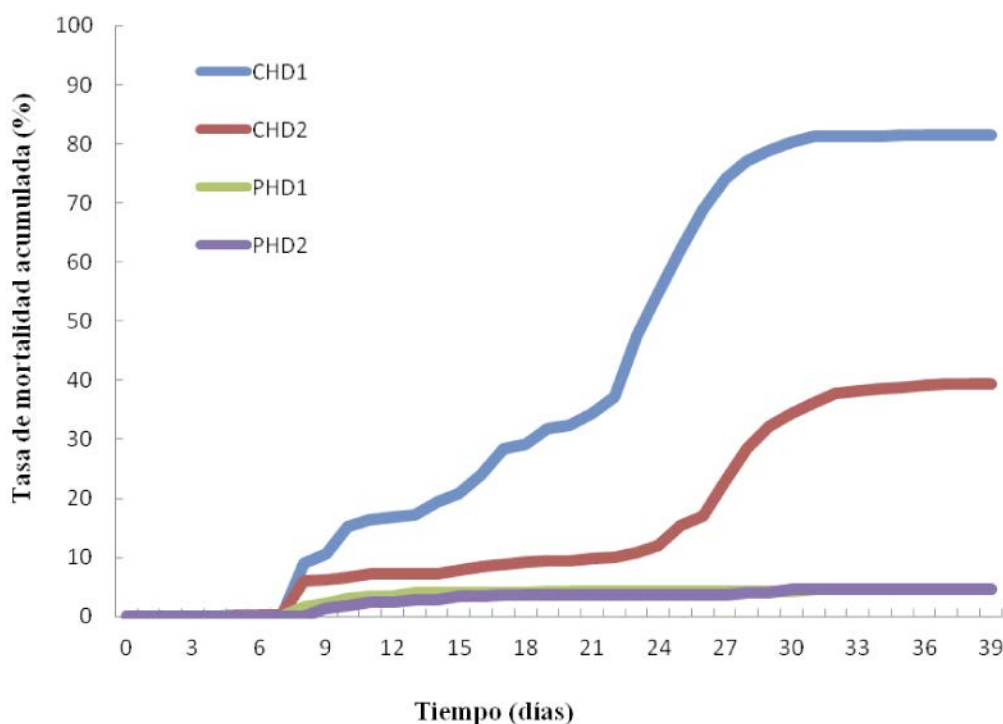


Figura 17. Tasa de mortalidad acumulada observada en los tanques con alta densidad de lenguados y alimentados con la dieta Control (CHD1 y CHD2) o suplementada con Pdp11 (PHD1 y PHD2).

Para determinar las especies microbianas causantes de la infección se tomaron muestras en condiciones de asepsia de la superficie de las úlceras (Figura 16), así como del hígado y riñón de los peces afectados. Dichas muestras se cultivaron en medios y condiciones adecuadas para el crecimiento bacteriano. Posteriormente, se aislaron dos tipos diferentes de colonias bacterianas las cuales se identificaron como *V. harveyi* (número de acceso GenBank HM584117) y *V. parahaemolyticus* (números de acceso del GenBank JK134442 y KC2110810), presentes tanto en las muestras de úlcera como en las de los órganos internos.

4.2. Análisis de la microbiota intestinal

Los dendrogramas obtenidos a partir de los patrones de bandas de DGGE de la microbiota intestinal de los ejemplares de los grupos ensayados se muestran en la Figura 18. Tanto a día 19 como a 30 caben destacar las diferencias entre ambos grupos experimentales en función de la densidad (similitudes no superiores al 15% en todos los casos) mientras que las similitudes intragrupo fueron del 87%.

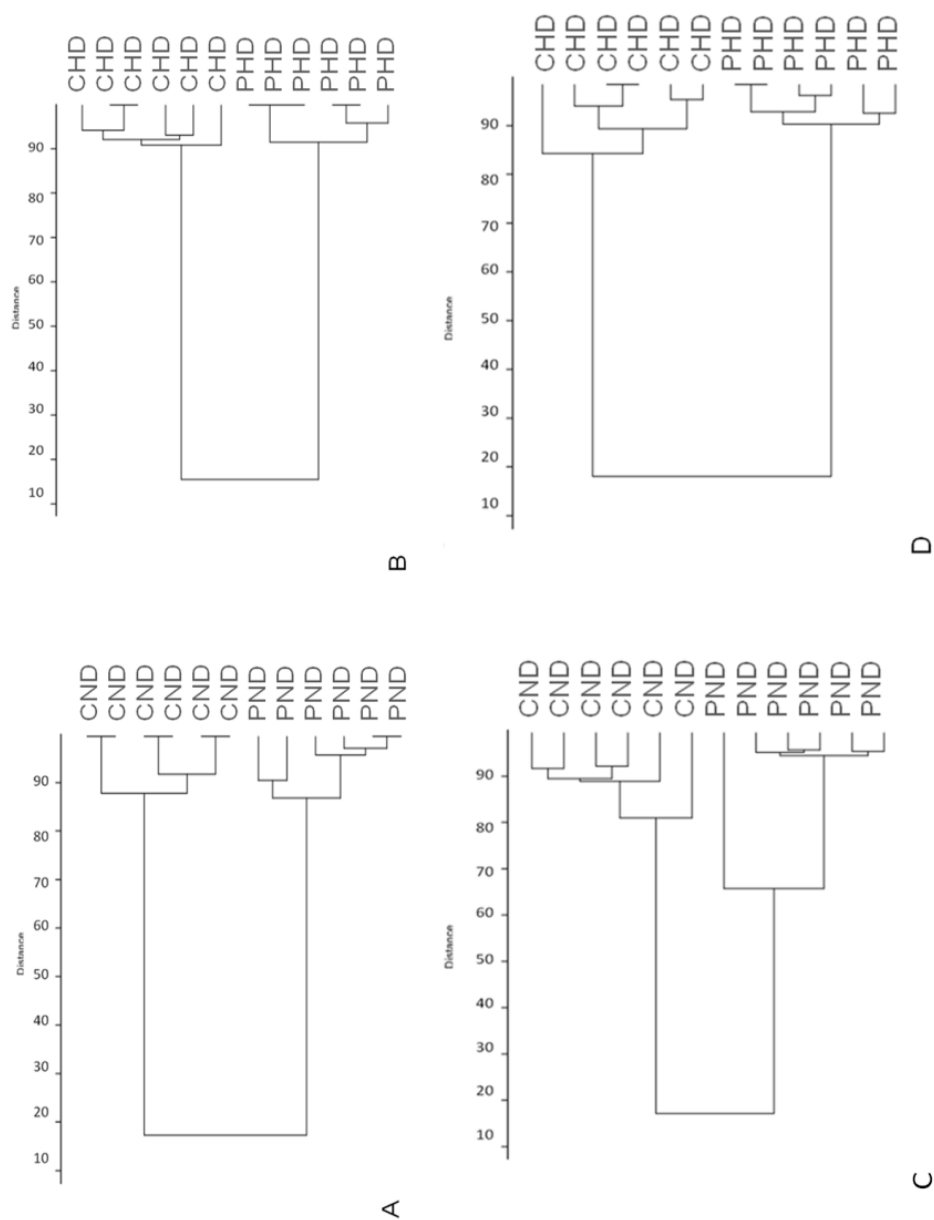


Figura 18. Dendrogramas obtenidos a partir del análisis del patrón de bandas obtenido en gel de electroforesis en gradiente desnaturalizante (DGGE) de la microbiota intestinal de individuos de *S. senegalensis* alimentados con una dieta comercial (C) y ejemplares alimentados con una dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (P) y expuestos a una densidad normal (CND y PND) y a elevada densidad de población (CHD y PHD) tras 19 (Figura 18A y B, respectivamente) y 30 días (Figura 18C y D, respectivamente) del inicio del experimento.

Los valores de los distintos índices ecológicos calculados para cada uno de los grupos se muestran en la Tabla 26.

La alimentación con la dieta suplementada con probiótico dio lugar a una disminución significativa en los valores de diversidad (H'), riqueza (R) y habitabilidad (R_r) de la microbiota intestinal en comparación con los valores de los peces alimentados sin probiótico, siendo esta reducción superior al prolongar el tiempo de ensayo.

En cuanto al efecto de las altas densidades de población en los lenguados alimentados con dieta Control, se observó únicamente una reducción significativa en la riqueza de la microbiota del grupo CHD tras 30 días de ensayo. Por el contrario, la administración del probiótico a los peces sometidos a sobrepoblación se tradujo en una disminución en los valores de riqueza, diversidad y habitabilidad de forma significativa a lo largo del tiempo (Tabla 26).

Tabla 26. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (R_r) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dieta comercial (C) y ejemplares alimentados con una dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (P) y expuestos a una densidad normal (CND y PND) y a elevada densidad (CHD y PHD) tras 19 y 30 días del inicio del experimento. ^aIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 comparada con respecto a los ejemplares Control. ^bIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ejemplares muestreados a día 19 con respecto a los muestreados a día 30. ^cDiferencias significativas ($p < 0,05$) entre los ejemplares cultivados a densidad normal con respecto a densidad alta.

Día	Tratamiento	H'	R	R_r
19	CND	$2,38 \pm 0,12$	$35,00 \pm 3,27$	$282,00 \pm 23,59$
	PND	$1,46 \pm 0,24^{ab}$	$15,00 \pm 4,28^a$	$151,45 \pm 4,50^a$
	CHD	$2,30 \pm 0,23$	$34,00 \pm 2,03$	$256,00 \pm 13,17$
	PHD	$2,18 \pm 0,28^c$	$28,00 \pm 1,29^{ac}$	$135,00 \pm 5,00^{ab}$
30	CND	$2,52 \pm 0,85$	$37,00 \pm 2,38$	$275,00 \pm 13,65$
	PND	$1,39 \pm 0,20^{ab}$	$18,00 \pm 2,77^a$	$58,43 \pm 9,20^{ab}$
	CHD	$2,38 \pm 0,32$	$29,00 \pm 1,00^{bc}$	$266,67 \pm 4,71$
	PHD	$1,62 \pm 0,01^{abc}$	$21,00 \pm 1,00^{ab}$	$98,67 \pm 2,98^{abc}$

Tras secuenciar los fragmentos de ADNr 16S de 100 clones de cada grupo ensayado, se llevó a cabo la identificación de los mismos mediante comparación de la secuencia con las disponibles en la base de datos de GenBank (Tabla 27). En la microbiota intestinal de todos los grupos se detectaron γ -Proteobacterias y Mollicutes (Figura 19). Se detectaron miembros del grupo de Actinobacterias en los peces Control; sin embargo, en la microbiota intestinal de los individuos tratados con la dieta probiótica no se detectó ningún miembro de este grupo, independientemente de la densidad y tiempo ensayado. Los miembros del grupo de γ -Proteobacterias se detectaron con mayor frecuencia en los ejemplares de todos los grupos ensayados, llegando a representar entre un 41%-73% de los clones totales (Figura 19). Los Firmicutes representaron hasta un 25% de los clones totales y en la mayoría de los grupos en los que se detectó se relacionaron con *Candidatus* Arthromitus (Clase *Clostridia*) (Figura

19A), mientras los clones relacionados con *Lactobacillus* (Clase *Bacilli*) se detectaron sólo en la microbiota intestinal de los peces Control expuestos a altas densidades (Figura 19B). Igualmente se observaron cambios importantes en las especies del grupo de γ -Proteobacteria en función de la densidad de cultivo (Figura 19). Así, los clones relacionados con el género *Pseudomonas* se secuenciaron principalmente en el tracto gastrointestinal de los peces sometidos a altas densidades de cultivo, en tanto que los clones relacionados con *P. damsela* subsp *piscicida* no se detectaron en los peces Control expuestos a altas densidades de cultivo ni en el grupo PND a día 30. Cabe destacar que la microbiota intestinal de la mayoría de los individuos de los distintos grupos estudiados presentó porcentajes elevados de clones relacionados con el género *Vibrio*. De estos clones, un alto número de ellos estaban relacionados con el grupo Harveyi, como *V. parahaemolyticus*, llegando a representar entre 10%-15% del total de clones en ambos grupos Control (CND y CHD) (Tabla 27). La microbiota intestinal de los peces del grupo CHD mostró una mayor diversidad de especies, detectándose clones relacionados con *V. campbellii* y *V. harveyi*. Por el contrario, estas dos especies no se detectaron en el tracto gastrointestinal de ninguno de los ejemplares alimentados con la dieta probiótica, independientemente de la densidad de cultivo ensayada (Tabla 27). Clones relacionados con *V. ichthyenteri* y *V. scopthalmi* (3%) se detectaron tanto a día 19 como a 30 sólo en la microbiota intestinal de los ejemplares PHD.

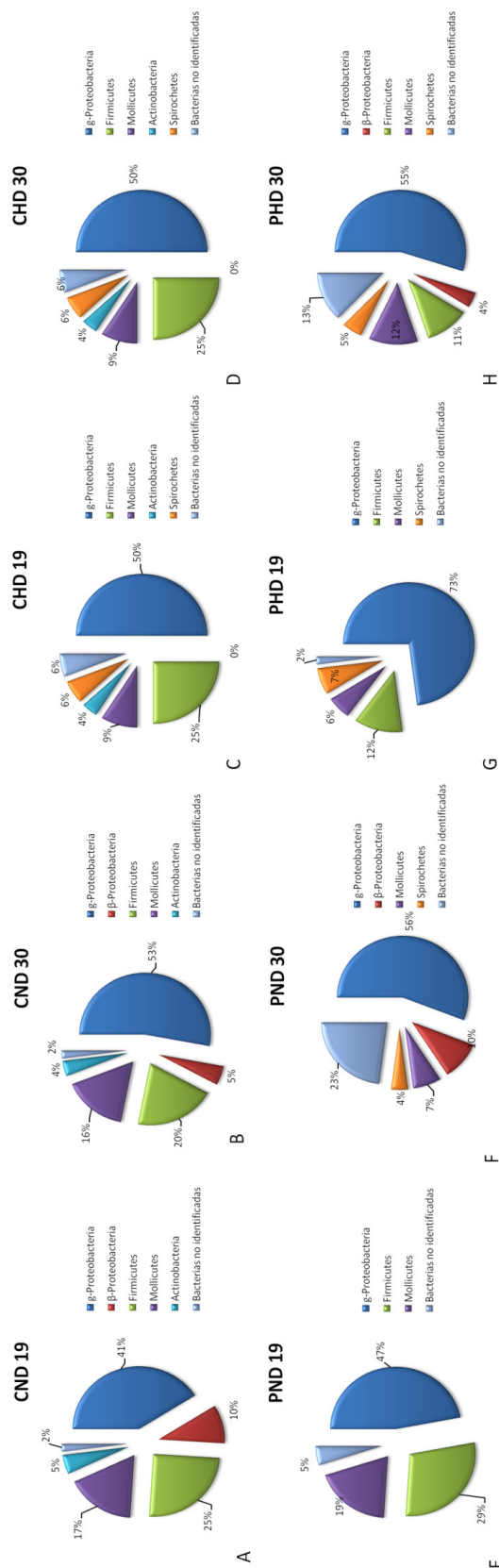


Figura 19. Abundancias relativas de los diferentes grupos microbianos secuenciados a partir de la microbiota intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* tras 19 y 30 días de ensayo. A: Ejemplares alimentados con una dieta comercial o probiótica expuestos a una densidad normal (CND y PND, respectivamente). B: Ejemplares alimentados con una dieta comercial o probiótica expuestos a una densidad alta (CHD y PHD, respectivamente).

Tabla 27. Identificación de los clones obtenidos a partir de los fragmentos de ADNr 16S de la microbiota intestinal, porcentaje de similitud de las secuencias en la base de datos GenBank, número de acceso y porcentaje de clones detectados. Ejemplares alimentados con una dieta comercial o probiótica expuestos a una densidad normal (CND y PND, respectivamente) y ejemplares alimentados con una dieta comercial o probiótica expuestos a una densidad alta (CHD y PHD, respectivamente).

Nº clon	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso GenBank	Porcentaje de clones (%)							
				19 días		30 días		19 días		30 días	
				CND	PND	CND	PND	CHD	PHD	CHD	PHD
β-Proteobacterias											
30	β-Proteobacteria T7_182 no cultivada	97	FM206221	15	0	5	13	0	0	0	4
γ-Proteobacterias											
1	Acinetobacter sp V(2012)	99	JN820158	0	0	0	0	0	5	0	5
2	Allivibrio sp T3	98	KC753328	0	0	0	0	10	0	6	0
3	Photobacterium damsela subsp piscicida 0029	99	KC466554	0	4	0	0	0	2	0	0
4	Photobacterium damsela subsp piscicida 001-B04	100	HQ599852	4	5	4	0	0	4	0	0
5	Photobacterium damsela subsp damsela JCM8968	99	JX916292	0	10	0	0	0	5	0	5
6	Pseudomonas sp NJ12	98	KC880363	0	0	0	0	0	5	0	5
7	Pseudomonas sp RS-A-12	99	KC430953	0	0	0	0	0	2	0	1
8	Pseudomonas sp RS-A-14	100	KC430955	0	0	0	0	5	0	8	0
9	Pseudomonas sp s221	99	HM196836	0	0	0	0	0	10	0	10
10	Pseudomonas putida PSS5	98	KC426926	0	0	0	0	10	0	10	0
11	Pseudomonas putida VSHUB043	98	KC713614	0	0	0	19	0	6	0	5
12	Pseudomonas putida ZJB-LLJ	100	JQ824856	0	0	0	0	5	0	1	1
13	Pseudomonas sp. 120516 no cultivada	99	AB773210	0	0	0	0	10	0	5	0
14	Vibrio sp A3E no cultivada	100	HQ897301	0	0	0	0	0	2	0	2
15	Vibrio sp P-F2	99	HQ897566	2	0	5	0	0	0	0	0
16	γ-Proteobacteria NL5BD-01-D01 no cultivada	98	FM852401	0	0	0	7	0	5	0	0
17	γ-Proteobacteria KK_D06_T-20070605 no cultivada	99	JX435684	3	0	12	0	6	0	0	0

Tabla 27 (continuación)

Nº clon	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso GenBank	Porcentaje de clones (%)															
				19 días				30 días				19 días				30 días			
				CND	PND	CND	PHD	CND	PND	CND	PHD	CND	PHD	CND	PHD				
γ-Proteobacterias																			
18	<i>Vibrio</i> sp CL1	99	JX028553	0	0	0	0	14	0	5	0	0	0	0	0				
19	<i>Vibrio</i> sp HE_C5	100	FJ178094	0	15	0	5	0	2	0	2	0	0	2	2				
20	<i>Vibrionaceae</i> P_C5	97	FJ178091	0	0	0	3	6	0	12	4	0	0	0	0				
21	<i>Vibrio campbelli</i> VSD714	99	KC534349	0	0	0	0	2	0	2	0	2	0	0	0				
22	<i>Vibrio ichthyenteri</i> FK-1	99	AM181657	0	0	0	0	0	2	0	2	0	0	2	2				
23	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SF11070701B	99	JQ904784	0	0	0	0	0	10	0	10	0	0	10	10				
24	<i>Vibrio natriegens</i> C170	98	AB719184	12	7	15	4	3	3	3	6	4	0	0	0				
25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CT11	99	JX134442	10	15	3	20	3	3	3	5	3	3	5	3				
26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M2-31	100	KC210810	5	0	10	0	1	0	10	0	10	0	0	0				
27	<i>Vibrio scophthalmi</i> D725	99	JF836195	0	0	0	0	0	3	0	3	0	3	0	3				
28	<i>Vibrio azureus</i> CD21	99	KC210817	7	0	8	0	0	0	0	7	0	0	7	0				
29	<i>Vibrio harveyi</i>	99	HM584117	0	0	0	0	1	0	0	4	0	0	4	0				
Actinobacteria																			
31	<i>Rhodococcus</i> sp TM1	99	AY642534	5	0	6	0	0	0	0	0	0	0	0	0				
32	<i>Actinobacteria</i> SC3-K184 no cultivada	98	HF584566	0	0	0	0	0	6	0	4	0	0	4	0				
Espiroquetas																			
43	<i>Brevinema andersonii</i> MV116	97	L31544	0	0	0	4	3	3	3	3	3	3	3	3				
44	<i>Brevinema andersonii</i> ATCC 43811	97	GU993264	0	0	0	0	0	2	0	0	2	0	2	2				
45	<i>Spirochete</i> TP-1 no cultivada	97	DQ340184	0	0	0	0	3	0	3	0	3	0	3	0				
46	<i>Spirochete</i> 190026 no cultivada	98	AB194657	0	0	0	0	0	3	0	3	0	3	0	0				

Tabla 27 (continuación)

Nº clon	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso GenBank	Porcentaje de clones (%)							
				19 días		30 días		19 días		30 días	
				CND	PND	CND	PND	CHD	PHD	CHD	PHD
Firmicutes											
33	Candidatus Arthromitus	97	AP122210	5	5	1	0	1	1	0	1
34	Candidatus Arthromitus SFB-rat Yit	100	DQ857141	10	13	0	0	0	3	0	3
35	Candidatus Arthromitus	99	NR_074450	10	0	10	0	10	0	0	0
36	Candidatus Arthromitus	99	AM117157	0	0	0	0	0	1	0	1
37	Lactobacillus sp no cultivada	100	AM117177	0	0	0	0	6	0	4	0
Mollicutes											
38	Mycoplasma sp C10	99	DQ340196	10	8	10	4	5	2	0	8
39	Mycoplasma iowae ATCC 33552	99	JN935877	0	3	0	0	0	0	0	0
40	Mycoplasma microti IL371	98	NR_025055	4	10	5	3	4	2	3	0
41	Mycoplasma muris	99	HQ897566	3	0	3	0	0	0	3	0
42	Mycoplasma sp k.b-1 no cultivada	99	HM031446	0	0	0	0	0	2	0	10
Bacterias identificados											
47	Bacteria EXO 15432 no cultivada	98	FM242723	3	5	3	4	3	0	0	3
48	Bacteria 2B no cultivada	97	FN396941	0	0	0	0	2	2	3	3

La contribución de cada grupo bacteriano a la disimilitud de ambos grupos (CHD y PHD) fue diferente en función del tiempo (Tabla 28). Dicha tabla refleja que el grupo de γ -Proteobacterias fue responsable de la mayor parte de las diferencias en la microbiota de los ejemplares de los grupos CHD y PHD tanto a los 19 como a los 30 días de inicio del experimento (49,65% y 23,00%, respectivamente). Asimismo, el grupo Firmicutes contribuyó con el 25,52% a los 19 días, en tanto que a día 30 los grupos responsables de la similitud fueron Mollicutes (10,70%), Espiroquetas (18,00%) y un grupo de bacterias no identificadas (casi 23,00%) (Tabla 28).

Tabla 28. Análisis SIMPER para determinar la contribución de cada grupo bacteriano en la disimilitud total de la microbiota de *S. senegalensis* alimentados con una dieta comercial (C) y ejemplares alimentados con una dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (P) y expuestos a una densidad normal (CND y PND) y a elevada densidad (CHD y PHD) tras 19 y 30 días del inicio del experimento. Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Grupos bacterianos	CHD-PHD	
	Día 19	Día 30
β -Proteobacteria	0,00	9,00
γ -Proteobacteria	49,65	23,00
Actinobacteria	8,51	9,00
Espiroquetas	1,42	18,00
Firmicutes	25,52	7,38
Mollicutes	8,52	10,70
Bacterias no identificadas	6,38	22,92

4.3. Expresión génica en hígado de *Solea senegalensis*

El efecto de la densidad de individuos y la dieta sobre la transcripción del grupo de genes seleccionados se determinó mediante la cuantificación del número de transcritos cuyos valores se muestran en la tabla 29. Para ver qué genes presentaban una expresión diferencial en función de la dieta y densidad poblacional, los primeros resultados se obtuvieron a partir del cDNA derivado de la mezcla del ARN obtenido de 5 individuos de cada tratamiento. Dado que con estos resultados no fue posible realizar análisis estadísticos, se estableció un criterio arbitrario en los que cambios que implicaron variaciones de expresión de $\geq 2,0$ unidades, se tomaron como diferentes. Siguiendo este criterio, a día 19 los genes C7, HP, HSP70, g-LYZ y NARS mostraron una disminución en el número de copias de su ARNm en el caso de los peces de los grupos CHD y PHD en comparación con los ejemplares de los grupos CND y PND. Los genes HSP70 y g-LYZ exhibieron un comportamiento similar también a los 30 días del inicio del experimento. En cambio, los peces del grupo Control expuestos a una alta densidad de cultivo (CHD) exhibieron a los 30 días mayores niveles de transcritos de los genes C7, HAMP1, HP, NARS, NCCRP1 y TNF α , en comparación con peces cultivados bajo condiciones normales de densidad (CND) (Tabla 29). Cabe destacar que en peces alimentados con la dieta probiótica (PHD) las cantidades de estos transcritos disminuyó,

recuperando los niveles similares a los obtenidos en peces cultivados bajo las condiciones normales de densidad (CND y PND).

Tabla 29. Transcripción absoluta a partir de la mezcla de ARN procedentes de las muestras de hígados (≥ 5 individuos/condición). Los datos se refieren a los transcritos de moléculas por pg del total de ARN. Números en negrita hacen referencia una expresión dos veces mayor mientras que los números en cursiva indican una expresión dos veces menor que sus respectivos controles. ^aComparación entre individuos expuestos a altas densidades de individuos vs individuos expuestos a densidades normales; ^bComparación entre individuos cultivados durante 30 días vs individuos cultivados durante 19 días; ^cComparación entre individuos alimentados con la dieta probiótica vs individuos alimentados con la dieta Control.

Gen	19 días				30 días			
	CND	PND	CHD	PHD	CND	PND	CHD	PHD
C3	8182	7124	6203	5308	4622	5128	6311	5308
C7	120	143	56 ^a	63 ^a	81	104	665^{ab}	118 ^c
HAMP1	4,10	3,50	2,80	2,70	3,00	2,00	239^{ab}	3,60 ^c
HP	280	202	101 ^a	85 ^a	148	155	819^{ab}	202^{bc}
HSP70	0,08	0,17^c	0,04 ^a	0,02 ^{ac}	0,67^b	0,05 ^{bc}	0,17 ^{ab}	0,03 ^c
HSP90AB	224	257	382	311	172	224	248	424
g-LYZ	2,30	2,80	1,30 ^a	0,85 ^a	2,60	2,70	0,99 ^a	1,0 ^c
NARS	6,30	5,20	3,10 ^a	2,30 ^a	3,20	2,90	20^{ab}	3,90 ^c
NCCRP1	0,17	0,12	0,10	0,08	0,11	0,16	7,40^{ab}	0,10 ^c
TFNα	24	38	47	44	23	37	863^{ab}	41 ^c

Para validar exactamente la sobreexpresión y represión de los genes transcritos y determinar el efecto de la variabilidad entre individuos, se realizaron cuantificaciones de forma absoluta mediante qPCR y de forma individual, es decir, para cada ejemplar, y para cuatro de los genes previamente analizados: C7, HAMP1, HP y g-LYZ (Figura 20). Estas nuevas cuantificaciones confirmaron los resultados obtenidos previamente, con las muestras en las que se mezcló el ARNm de los ejemplares de cada tratamiento.

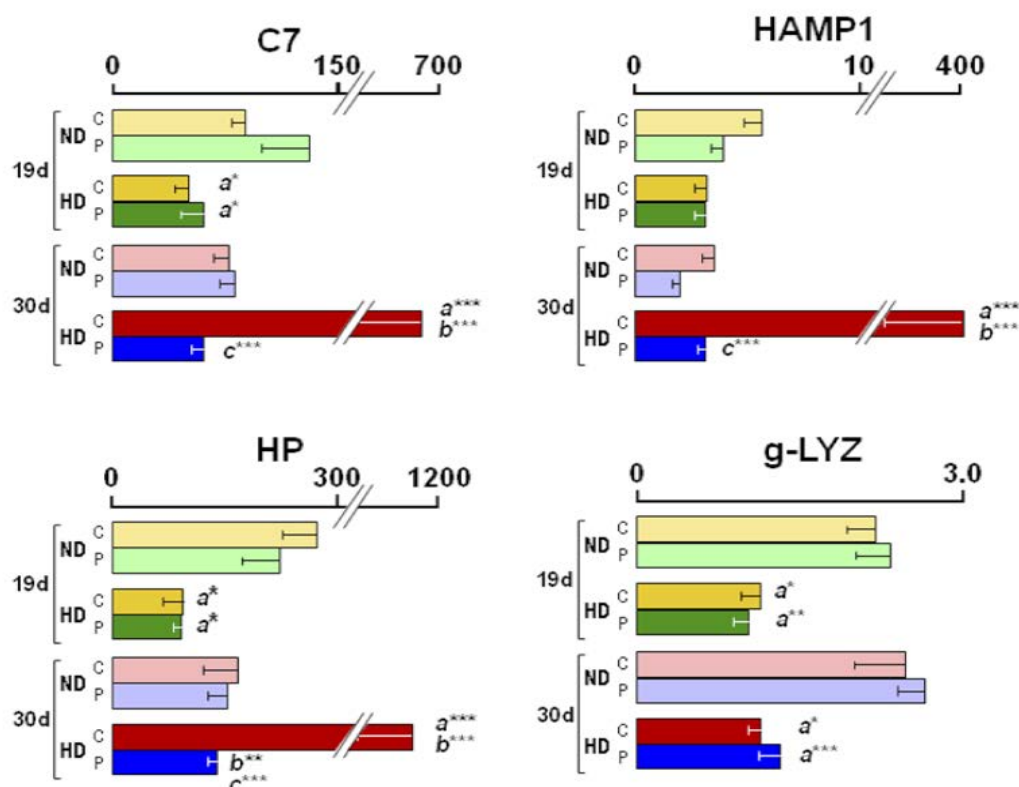


Figura 20. Niveles de transcritos de los genes HAMP1, C7, HP y g-LYZ. Los datos se muestran con sus valores medios \pm SEM de moléculas de transcritos/pg del total de ARN de al menos 5 peces de cada grupo. Las comparaciones se realizaron mediante un test de t-Student's. Diferencias estadísticamente diferentes se expresan como *** $p < 0,001$, ** $p < 0,01$ * y $p < 0,05$. a: comparaciones realizadas entre individuos expuestos a altas densidades *vs* individuos expuestos a densidades normales; b: comparación realizada entre peces cultivados 30 días *vs* peces cultivados durante 19 días; c: comparaciones realizadas entre peces tratados con el probiótico *vs* peces Control. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con una dieta comercial (C) o suplementada con probiótico (P) y expuestos a una densidad de cultivo alta o normal (ND y HD) durante 19 y 30 días.

4.4. Estudio histológico del intestino de *Solea senegalensis*

Los cambios a nivel histológico en el intestino anterior de los peces de los diferentes grupos experimentales se analizaron mediante microscopía óptica, resumiéndose las medidas morfométricas en la Tabla 30. Estos resultados mostraron diferencias estadísticamente significativas en la altura de las vellosidades intestinales y el diámetro del intestino en peces de los grupos cultivados a alta densidad (CHD y PHD) tanto a día 19 como a día 30. La inclusión de los probióticos en la dieta de los peces independientemente de la densidad de cultivo, dio lugar a una disminución del diámetro del intestino de forma significativa, con respecto a los valores encontrados en el intestino de peces alimentados con la dieta Control y cultivados bajo una densidad normal (grupo CND). El número total de células caliciformes fue similar en todos los grupos a día 19, si bien fueron significativamente mayores especialmente en aquellos peces que recibieron tratamiento con el probiótico (grupo PHD).

Tabla 30. Representación de la altura media de las microvellosidades intestinales, diámetro y el número de células caliciformes en el intestino de *S. senegalensis*. Los valores se representan como el valor medio \pm error estándar. Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas. VH: altura de las microvellosidades en el intestino de *S. senegalensis*; D: diámetro; PAS+: número de células caliciformes teñidas con la técnica de ácido peryódico en 1000 μm^2 ; PAS+AB+: número de células caliciformes teñidas con la técnica de ácido peryódico y azul alcian en 1000 μm^2 . Diferentes letras en la misma columna denotan diferencias significativas ($p < 0,05$).

Día	Tratamiento	VH (μm)	D (μm)	Células caliciformes		
				PAS+	PAS+AB+	Total
19	CND	574,4 \pm 16,4 ^a	2572,3 \pm 34,1 ^a	56,0 \pm 13,1 ^a	42,3 \pm 8,2 ^a	98,4 \pm 17,4 ^a
	PND	595,3 \pm 15,8 ^a	2384,0 \pm 54,8 ^b	70,3 \pm 26,5 ^a	44,5 \pm 17,7 ^a	114,8 \pm 34,3 ^a
	CHD	521,7 \pm 10,6 ^b	1750,8 \pm 27,8 ^c	84,9 \pm 19,9 ^a	59,5 \pm 17,2 ^a	144,4 \pm 33,8 ^a
	PHD	463,1 \pm 9,9 ^c	1680,6 \pm 30,9 ^{cd}	40,0 \pm 10,3 ^a	34,8 \pm 6,4 ^a	94,8 \pm 13,5 ^a
30	CND	639,7 \pm 11,6 ^a	2187,3 \pm 27,9 ^a	36,5 \pm 9,5 ^a	33,1 \pm 11,5 ^a	69,6 \pm 15,6 ^a
	PND	509,9 \pm 9,6 ^b	1749,6 \pm 19,5 ^b	31,0 \pm 5,6 ^a	3,5 \pm 1,4 ^b	34,5 \pm 6,1 ^a
	CHD	433,7 \pm 9,1 ^c	1775,4 \pm 26,3 ^b	44,9 \pm 18,4 ^a	39,7 \pm 17,2 ^{ab}	84,6 \pm 35,1 ^b
	PHD	480,0 \pm 9,1 ^b	1708,4 \pm 37,0 ^b	83,1 \pm 12,5 ^b	38,5 \pm 8,6 ^c	121,6 \pm 17,1 ^c

4.5 Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados obtenidos en el ACP a los 30 días desde el inicio del experimento se muestran en la Figura 21, y permitieron establecer relaciones entre los clones secuenciados a partir de la microbiota intestinal y los datos de expresión génica, las tasas de mortalidad observadas y los resultados obtenidos en el análisis histológico. El resultado del ACP muestra que los dos primeros componentes (F1 y F2) fueron responsables del 68,53% de la varianza total (Figura 21A). El eje principal (F1) acumuló el 39,63% de la varianza. Se pudo observar una clara diferenciación de los clones microbianos a lo largo del eje de este primer factor (Figura 21A). Igualmente se pudo determinar cierto grado de correlación con la presencia de las células caliciformes (PAS) y aquellos clones que estaban presentes únicamente en los individuos del grupo PHD. En la figura 21B se observa que los ejemplares de los grupos CHD y PHD se diferenciaron en dos claros conjuntos correlacionados con el F1 de forma positiva y negativa, respectivamente.

El segundo eje (F2) acumuló el 29,66% de la varianza y se relacionó con los clones obtenidos a partir de los individuos del grupo CHD. Por otra parte, también el componente F2 mostró una correlación positiva con la altura de las vellosidades intestinales y con una serie de clones que estaban presentes en el intestino de peces del grupo CND, y que se relacionaron con *Allivibrio* (clon 2), *P. damsela* subsp. *piscicida* (clon 4), *Vibrio* (clon 15) y *Rhodococcus* (clon 31).

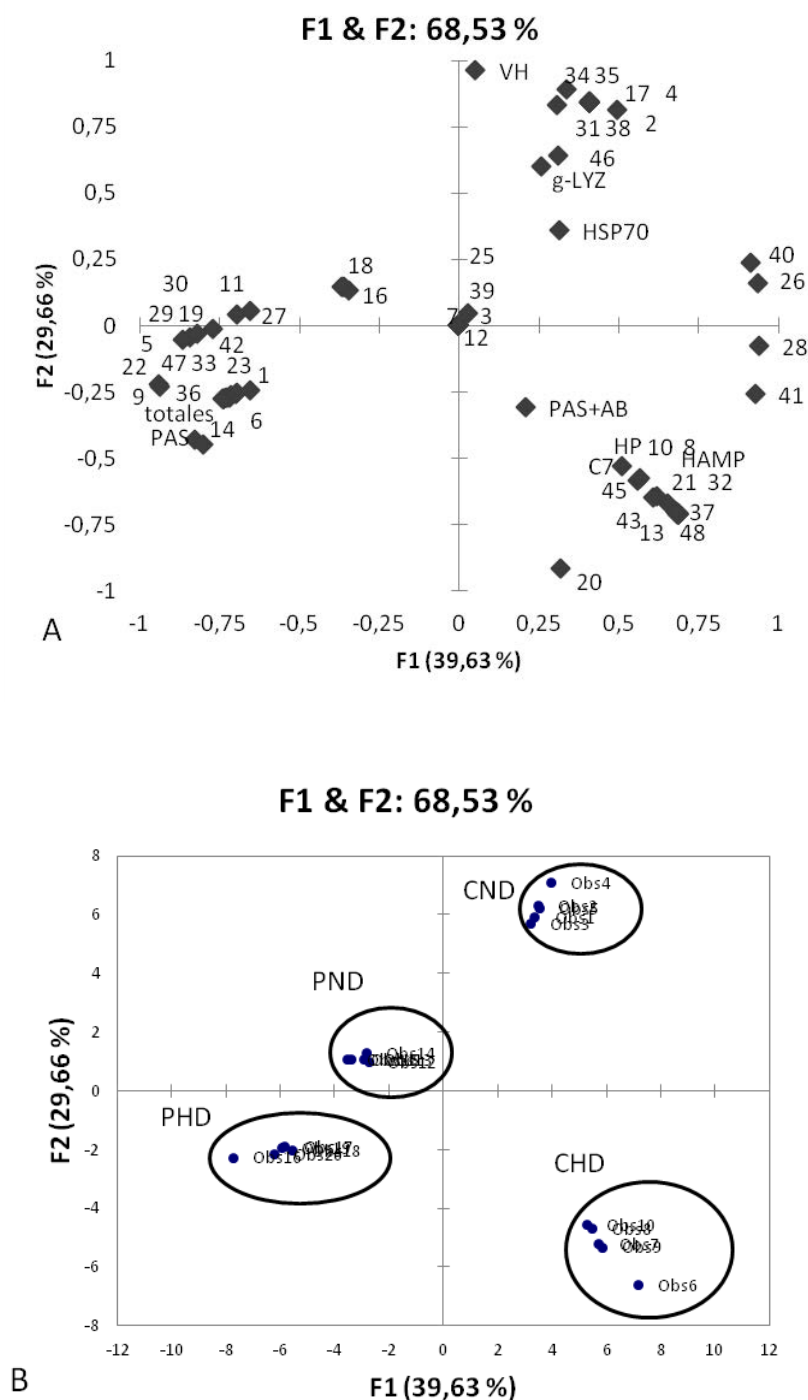


Figura 21. Análisis de Componentes Principales aplicado a las medidas obtenidas en cuanto a los datos de transcripción génica en hígado, composición de la microbiota intestinal, los datos obtenidos en las medidas morfométricas de la biología celular del intestino y las tasas de mortalidad de individuos de *S. senegalensis* alimentados con la dieta Control y con la dieta suplementada con probiótico expuesto a normal (CND y PND, respectivamente) o alta (CHD y PHD, respectivamente) densidades a día 30. Distribución de las variables a lo largo de los ejes (A). Distribución de los individuos de *S. senegalensis* a lo largo de F1 y F2 (B).

5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

5.1. Composición corporal

En la Tabla 31 se resumen los valores de supervivencia, peso, valores de proteínas y lípidos totales, así como de los principales ácidos grasos obtenidos en experimentos realizados conjuntamente con las Dras. I. García de la Banda y C. Lobo del IEO de Santander. En esta tabla se puede observar que a 90 dpe, el peso corporal de los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 resultó superior ($p<0,05$) al de los ejemplares alimentados con pienso comercial. También se observaron diferencias significativas en estos mismos peces ($p<0,05$) en el contenido en proteínas totales y la relación de niveles de ácidos grasos DHA/EPA.

Tabla 31. Porcentaje de supervivencia, valor peso corporal (mg), porcentajes de proteínas y lípidos totales (% peso seco), ácidos grasos (g/100 g de tejido) y relación DHA/EPA medidos en ejemplares de *S. senegalensis* de 90 dpe alimentados con la dieta comercial (Control) y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) (promedio \pm desviación típica). Los valores fueron proporcionados por la Dra. I. García de la Banda y Dra. C. Lobo del IEO de Santander, y se citan en Lobo y col., (2014). ^aDiferencias significativas ($p<0,05$) respecto al tratamiento Control.

	Control	Pdp11
Supervivencia (%)	63,30 \pm 3,80	53,10 \pm 11,00
Peso corporal final (mg)	725,30 \pm 75,60	944,60 \pm 95,70 ^a
Proteínas totales (% peso seco)	42,20 \pm 0,00	48,00 \pm 0,20 ^a
Lípidos totales (% peso seco)	18,70 \pm 1,80	17,70 \pm 2,20
Ácido linolénico (18:3n-3)	3,71 \pm 0,00	3,59 \pm 0,22
Ácido araquidónico (20:4n-6) ARA	1,94 \pm 0,10	2,13 \pm 0,03
Ácido eicosapentaenoico (20:5n-3) EPA	5,84 \pm 0,04	5,39 \pm 0,14
Ácido docosahexaenoico (22:6n-3) DHA	13,84 \pm 0,53	15,04 \pm 0,07
DHA/EPA	2,37 \pm 0,01	2,79 \pm 0,09 ^a

5.2. Análisis de la microbiota intestinal

Los dendrogramas obtenidos a partir del análisis de los patrones de bandas de DGGE de las muestras de intestinos mostraron la existencia de dos grupos claramente diferentes. Estos grupos se correspondieron a los ejemplares que recibieron cada una de las dietas ensayadas, y presentaron una similitud entre ellos menor del 30%. Los valores de similitud entre los individuos que recibieron la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 fue del 34% y del 46% en el caso de los ejemplares del grupo Control (Figura 22).

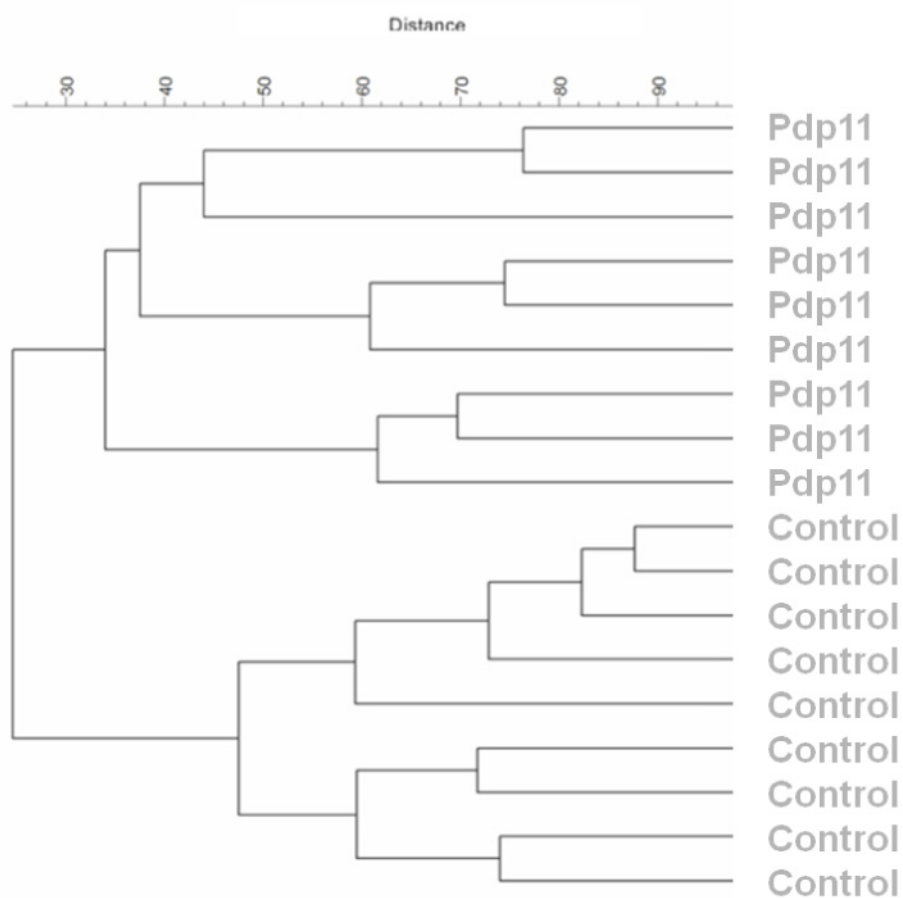


Figura 22. Dendrograma obtenido a partir del análisis de los patrones de bandas del gel de DGGE de la microbiota intestinal de larvas de *S. senegalensis* de 90 dpe alimentadas con *Artemia* (Control) y *Artemia* enriquecida con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11).

Los valores de los parámetros ecológicos de diversidad (H'), riqueza de especies (R) y habitabilidad (R_r) no mostraron diferencias significativas entre los grupos ensayados (Tabla 32).

Tabla 32. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (R_r) de la microbiota de ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11).

	H'	R	R_r
Control	$2,89 \pm 0,10$	$21,27 \pm 2,60$	110,25
Pdp11	$2,96 \pm 0,05$	$17,50 \pm 4,50$	132,48

Las bandas predominantes obtenidas en la DGGE se identificaron mediante secuenciación de las mismas y la mayoría se correspondieron a microorganismos del grupo γ -Proteobacteria (Tabla 33). En el caso de los ejemplares del grupo Control se detectaron bandas relacionadas con *Colwellia*, *Photobacterium angustum* y *V. hippocampi* que no estaban presentes en los patrones de las larvas que recibieron probiótico (Tabla 33). Por otra parte, en la microbiota de los peces alimentados con *Artemia* suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 se obtuvieron bandas relacionadas con especies como *V. fischeri*, *V. natriegens*, *V. shilonii*, *V. inositatus* y *S. putrefaciens* Pdp11 (Tabla 33).

Tabla 33. Identificación de las bandas de los geles de DGGE presentes en más del 50% de los peces de cada grupo, porcentaje de similitud de la secuencia de ADN_r 16S con las de la base de datos GenBank, número de acceso y valores medios de la intensidad de las bandas (relativa a la intensidad total de la muestra). Los valores de desviación típica fueron inferiores a 0,1%. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con la dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11).

Nº Banda DGGE	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso GenBank	Porcentaje de intensidad (%)	
				Control	Pdp11
γ-Proteobacteria					
10	<i>Acinetobacter</i> sp. G15-007-E05 no cultivado	99	FJ192797	10,86	11,12
3	<i>Colwellia</i> sp.	97	DQ492707	7,69	0
11	<i>Enterovibrio coralii</i>	98	AY292951	10,60	8,35
16	<i>Photobacterium angustum</i>	98	X74685	14,85	0
34	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	99	JX415533	0	3,70
4	<i>Vibrio</i> sp. S3659	97	FM878642	15,12	9,27
9	<i>Vibrio fischeri</i> ES144	97	FJ464360	0	8,35
2	<i>Vibrio hippocampi</i>	99	FN421434	12,73	0
33	<i>Vibrio inusitatus</i> W21	97	DQ922921	0	4,07
29	<i>Vibrio natriegens</i>	98	FM999825	0	10,39
6	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14398T	97	AJ421444	7,95	14,83
18	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	97	AB561143	9,55	16,70
30	<i>Vibrio shilonii</i>	98	HM000078	0	5,74
Bacterias no identificadas					
7	Bacteria S1cc26	96	DQ416581	10,60	7,41

Para determinar qué especies bacterianas aportaban una mayor contribución a las diferencias observadas entre la microbiota intestinal de las larvas de lenguados alimentados con las dietas Control y suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, se realizó un análisis de porcentajes de similitud (SIMPER) (Tabla 34).

Se pudo observar que 4 de las bandas identificadas contribuyeron en más de un 50% a la disimilitud entre los patrones de DGGE entre la microbiota intestinal de las larvas que recibieron o no el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11. Estas bandas estaban relacionadas con *P. angustum*, *V. natriegens*, *V. penaeicida* y *V. parahaemolyticus*. En el caso de las bandas que aparecieron únicamente en los ejemplares sometidos a la dieta con *S. putrefaciens* Pdp11 contribuyeron en su totalidad en un 34,13% a la disimilitud entre los patrones de bandas de DGGE.

Tabla 34. Análisis SIMPER para identificar la contribución de cada especie a la disimilitud total de la microbiota de *S. senegalensis* alimentados con dieta control (Control) y Artemia enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11). Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Nº banda DGGE	Especies	Control-Pdp11
10	<i>Acinetobacter</i> sp. G15-007-E05 no cultivado	6,73
3	<i>Cohvella</i> sp.	6,74
11	<i>Enterovibrio corallii</i>	1,17
16	<i>Photobacterium angustum</i>	12,57
34	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	3,22
4	<i>Vibrio</i> sp. S3659	6,88
9	<i>Vibrio fischeri</i> ES144	8,34
2	<i>Vibrio hippocampi</i>	5,88
33	<i>Vibrio inusitatus</i> W21	2,80
29	<i>Vibrio natriegens</i>	12,57
6	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14398T	14,15
18	<i>Vibrio parahaemolyticus</i>	11,72
30	<i>Vibrio shilonii</i>	7,20
7	Bacteria S1cc26	0,00

5.3. Análisis de componentes principales (ACP)

Los resultados del ACP que evaluaron la relación existente entre las diferentes variables (fisiológicas, bioquímicas y composición de la microbiota intestinal de los ejemplares larvarios) se muestran en la Figura 23. Los 2 ejes principales absorbieron una varianza total de casi el 70%. El eje principal F1 acumuló el 57,28 % de la varianza y estuvo relacionado con la presencia de especies detectadas sólo en la microbiota intestinal de larvas que recibieron el probiótico, tales como *V. fischeri* (banda 9), *V. natriegens* (banda 29), *V. shilonii* (banda 30) y *S. putrefaciens* Pdp11 (banda 34), junto con el contenido en proteínas, DHA, la relación

DHA/EPA y el incremento de peso (Figura 23A). También se pudo observar que este factor tenía una correlación negativa con ciertos microorganismos que estaban presentes de forma conjunta sólo en el intestino de larvas que recibieron la dieta Control, tales como *Colwellia* (banda 3) *Vibrio* sp. S3659 (banda 4) y *V. hippocampi* (banda 2) así como con los niveles de EPA. Dicho F1 fue el eje principal que separó claramente a los ejemplares de ambos grupos experimentales (Figura 23B).

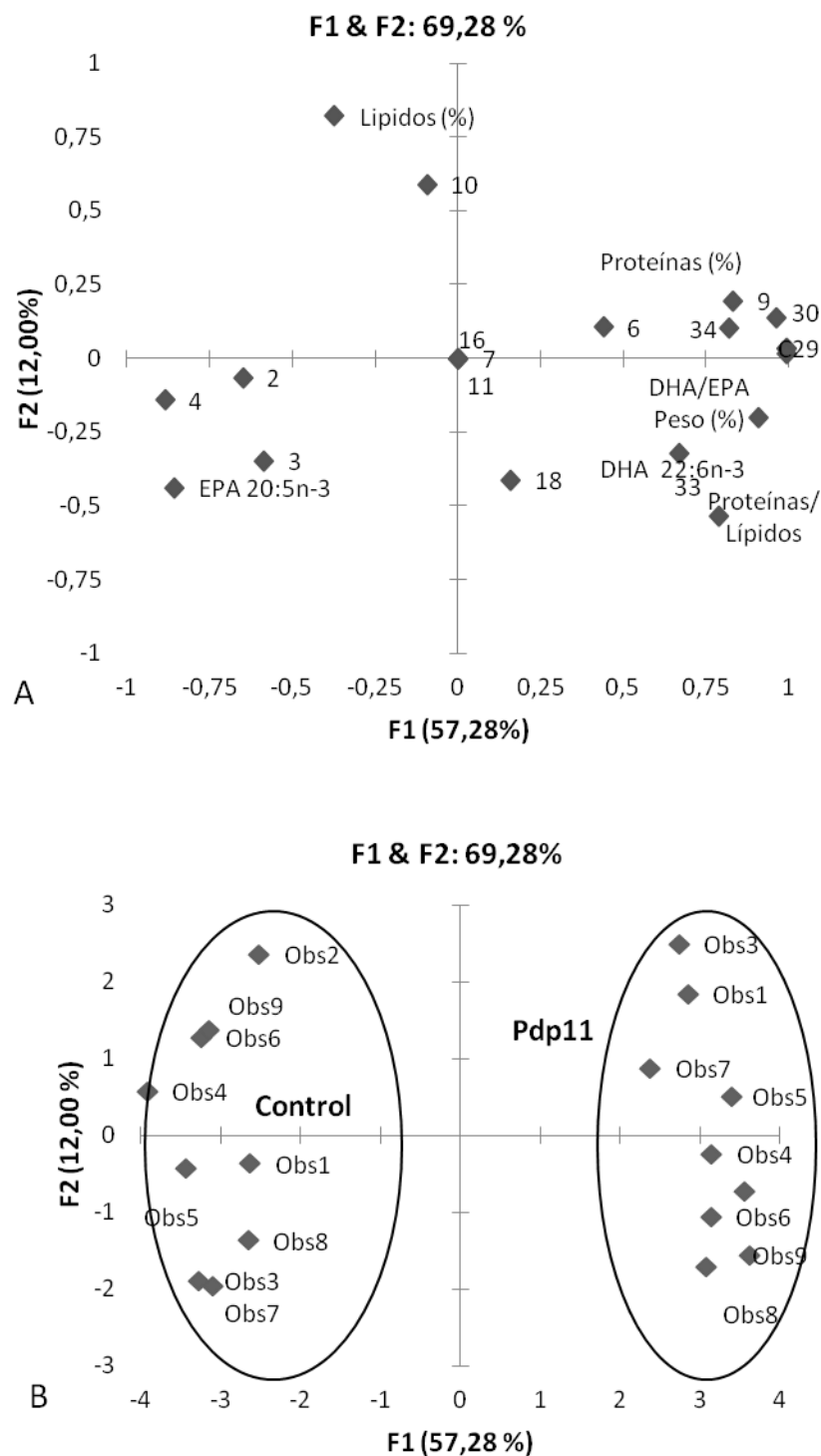


Figura 23. Análisis de Componentes Principales aplicado a las medidas obtenidas de la composición bioquímica y de la microbiota intestinal de los lenguados alimentados con dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) (A). Los números se corresponden a las bandas secuenciadas detectadas en los patrones de DGGE (B). La distribución de los individuos de *S. senegalensis* alimentados con la dieta Control y Control enriquecida con *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) a lo largo de los componentes F1 y F2.

6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

6.1. Análisis de la microbiota intestinal

El análisis de los patrones de DGGE mostró que la mayoría de los ejemplares alimentados con el probiótico y la mayoría de los individuos de la dieta Control quedaron separados en 2 grupos diferentes en función de su microbiota. A 23 dpe, 5 de 6 peces analizados del grupo alimentado con probiótico se agruparon con un 58% de similitud. Un comportamiento similar se observó en los ejemplares de 56 dpe y 87 dpe, mientras que la similitud entre los patrones de DGGE de las larvas recibiendo la dieta Control fue en todos los casos inferior y osciló entre 15 y 38% (Figura 24).

Los valores de los índices ecológicos de la microbiota intestinal de los ejemplares alimentados con la dieta Control y suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 se muestran en la Tabla 35. La riqueza de especies (R) de los ejemplares muestreados osciló entre $23,00 \pm 5,00$ y $31,30 \pm 3,00$ en todas las muestras intestinales, pero no se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto al tratamiento Control. Por el contrario, se observaron disminuciones significativas de los valores del índice de diversidad (H'), con una disminución de la diversidad de la microbiota en los intestinos de las larvas de 56 dpe ($2,10 \pm 0,20$) y 87 dpe ($2,01 \pm 0,10$) alimentadas con la dieta suplementada con el probiótico en comparación con sus grupos Controles ($2,60 \pm 0,10$ y $2,60 \pm 0,20$, respectivamente) (Tabla 35). Aunque los valores de habitabilidad (R_r) fueron elevados en todos los casos, nuevamente se observaron incrementos significativos en los ejemplares alimentados con probiótico y la dieta Control se observaron a 56 y 87 dpe.

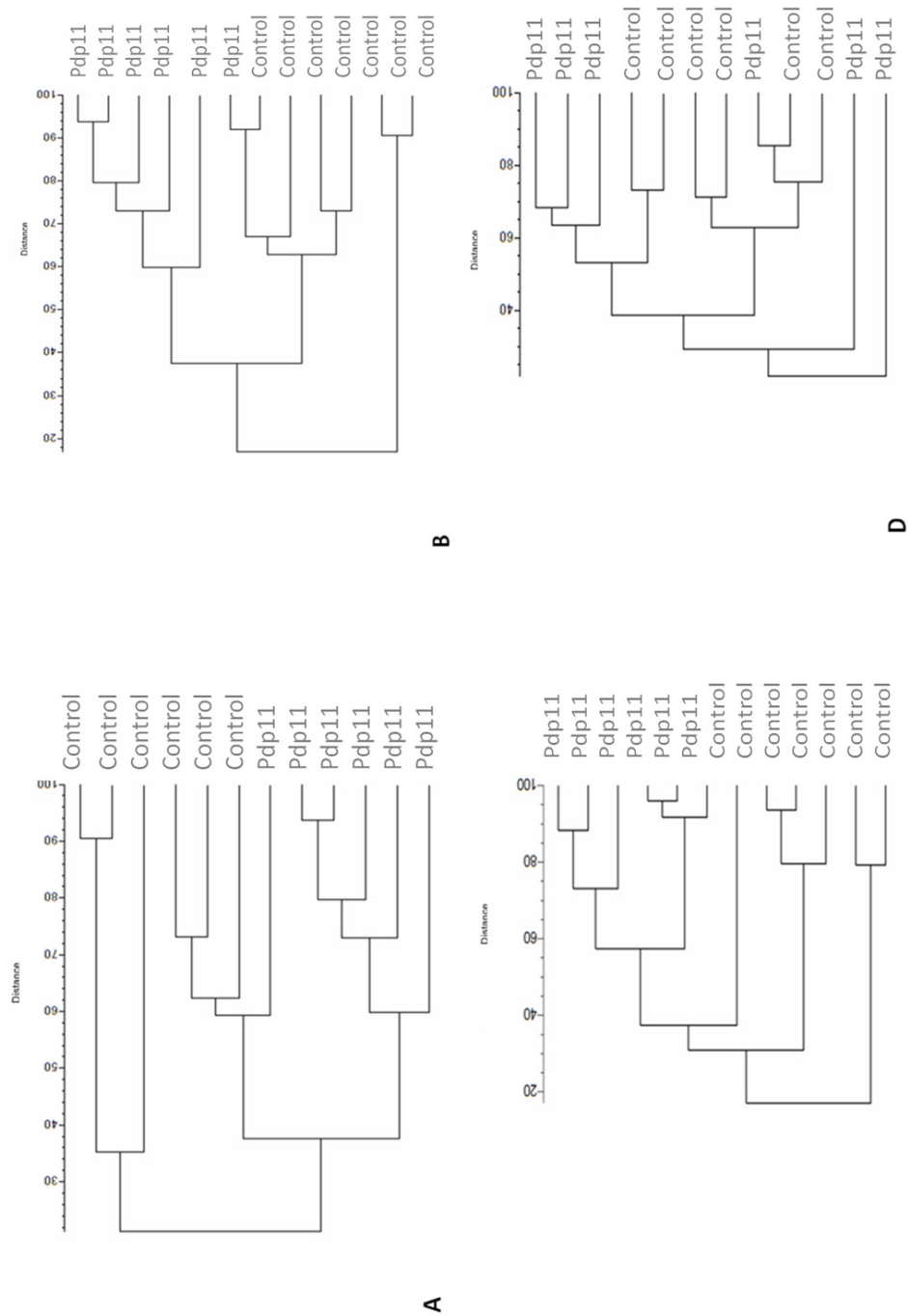


Figura 24. Dendrogramas realizados a partir del análisis de los patrones de bandas en los gels de DGGE de la microbiota intestinal alimentados con *S. senegalensis* de 23 dpe (A), 56 dpe (B), 87 dpe (C) y 119 dpe (D) alimentados con una dieta control (Control) y Artemia enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) desde 10 hasta 30 dpe

Tabla 35. Valores de diversidad (H'), riqueza de especies (R), y habitabilidad (Rr) de la microbiota intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* de 23 dpe (A), 56 dpe (B), 87 dpe (C) y 119 dpe (D) que habían recibido una dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11). Las larvas recibieron la dieta experimental desde 10 dpe hasta 30 días después de la eclosión. ^aIndica diferencias significativas ($p < 0,05$) referido a sus respectivos controles.

Tiempo (días)	Tratamiento	H'	R	Rr
23	Control	$2,6 \pm 0,2$	$23,0 \pm 5,0$	$105 \pm 20,5$
	Pdp11	$2,3 \pm 0,2$	$24,0 \pm 3,0$	$115 \pm 10,7$
56	Control	$2,6 \pm 0,1$	$31,0 \pm 2,0$	$115 \pm 9,2$
	Pdp11	$2,1 \pm 0,2^a$	$31,0 \pm 2,0$	$192 \pm 10,1^a$
87	Control	$2,6 \pm 0,2$	$25,0 \pm 3,0$	$125 \pm 15,2$
	Pdp11	$2,1 \pm 0,1^a$	$31,3 \pm 3,0$	$192 \pm 12,2^a$
119	Control	$2,8 \pm 0,1$	$25,3 \pm 2,0$	$125 \pm 10,1$
	Pdp11	$2,5 \pm 0,1$	$26,0 \pm 2,0$	$135 \pm 9,7$

Para caracterizar las especies microbianas correspondientes a las bandas predominantes de los geles de DGGE, se prepararon librerías de clones con las secuencias del ADN_r 16S de los productos de PCR utilizados en la DGGE. Se secuenciaron 100 clones para cada tratamiento y tiempo muestreado. Se compararon los fragmentos de ADN_r 16S clonados con los patrones de bandas obtenidos en la DGGE para identificar las especies correspondientes a cada banda. La Figura 25 muestra la distribución porcentual de los grupos microbianos detectados. Entre el 5% y el 21% de los clones, según tratamiento y tiempo, correspondieron a bacterias no identificadas, mientras que entre el 55% y el 68% de las bandas se identificaron como γ -Proteobacteria independientemente de la dieta administrada (Figura 25). También se detectaron otros grupos como *Firmicutes* (12-22% del total), *Actinobacteria* (1-13% del total) y *Mollicutes* (1-9% del total) (Figura 25).

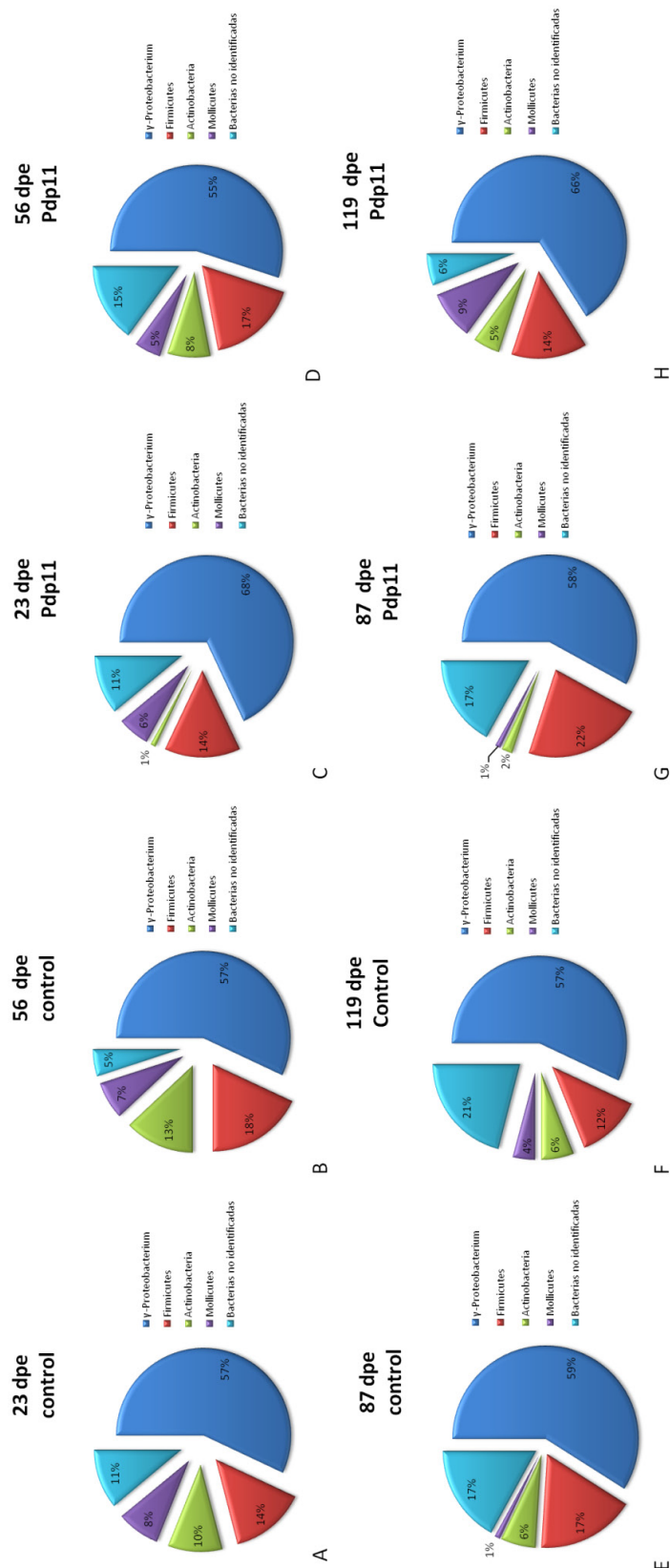


Figura 25. Abundancia relativa de los grupos bacterianos detectados en los intestinos de larvas de *S. senegalensis* alimentadas con una dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) desde el día 10 al 30 después de la eclosión (dpe). Las muestras fueron obtenidas a partir de intestinos de larvas de 23 dpe y 56 dpe del grupo Control (A y B) o del grupo Pdp11 (C y D), así como de larvas de los días 87 dpe y 119 dpe tanto del grupo Control (E y F) como del grupo Pdp11 (G y H). Los porcentajes son relativos al número total de clones obtenidos de cada tratamiento y tiempo.

La identificación de los clones obtenidos por comparación del análisis de secuencias de ADNr 16S se muestra en la Tabla 36. Los ejemplares que recibieron la dieta con *Artemia* (Control) mostraron un núcleo de bandas que se mantuvo a lo largo de todos los tiempos analizados. Estos clones se identificaron como *Brevibacillus parabrevis*, *V. campbellii* y *P. damsela* subsp. *piscicida* y especies de los géneros *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alliivibrio*, *Vibrio*, *Rhodococcus*, *Mycoplasma*, *Anoxibacillus*, *Geobacillus* (Figura 26).

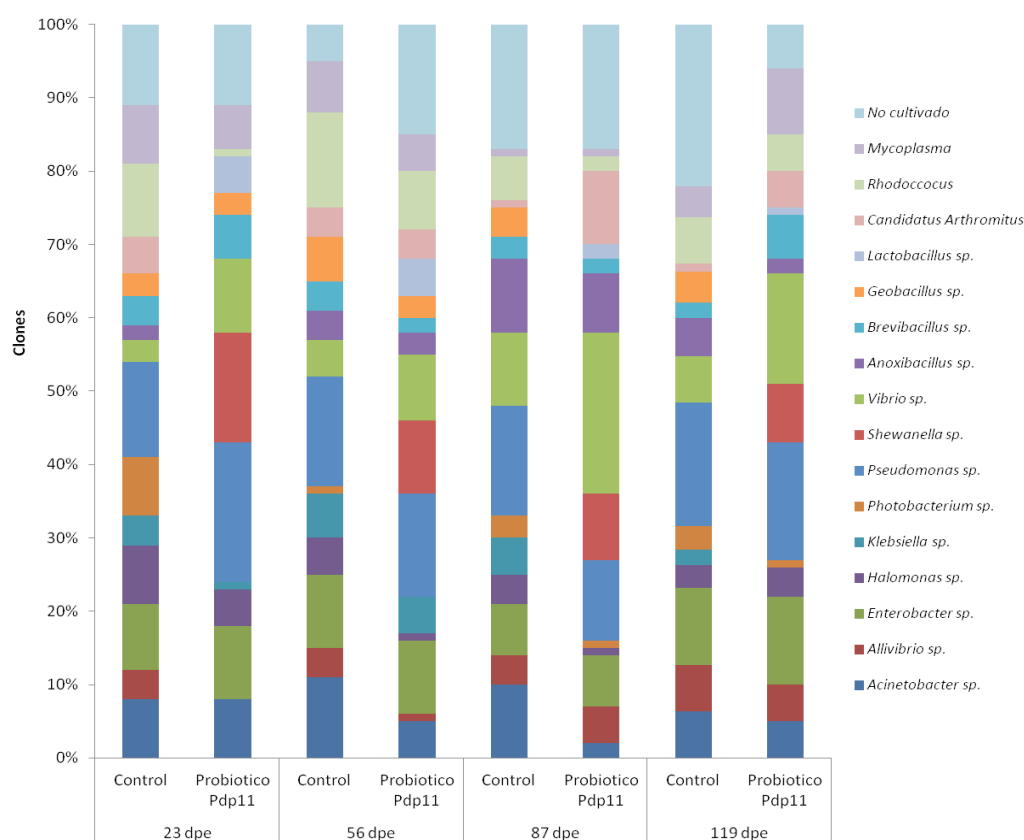


Figura 26. Abundancia relativa de los grupos bacterianos detectados en los intestinos de las larvas de *S. senegalensis* alimentadas con una dieta Control y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) desde los días 10-30 después de la eclosión (dpe). Las muestras se obtuvieron a partir de intestinos de larvas de 23 dpe, 56 dpe, 87 dpe y 119 dpe. Los porcentajes son relativos al número total de clones obtenidos de cada tratamiento y tiempo.

La microbiota intestinal de los ejemplares alimentados con las dietas control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 compartieron clones relacionados con los géneros *Acinetobacter*, *Brevibacillus*, *Enterobacter*, *Halomonas* y *Pseudomonas*, así como *V. campbellii* (Tabla 36). Por otro lado, y sólo en los ejemplares que recibieron la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 se observó un núcleo de clones relacionados con las especies *Lactobacillus helveticus*, *P. acephalatica*, *V. parahaemolyticus* y del género *Shewanella* sp. incluida *S. putrefaciens* Pdp11. Cabe destacar la ausencia o baja presencia de la especie *P. damsela* subsp.

piscicida en la microbiota intestinal de los ejemplares alimentados con la cepa probiótica *S. putrefaciens* Pdp11. La administración del probiótico resultó también en un incremento del número de clones correspondientes al género *Vibrio*.

Para conocer la contribución de cada grupo bacteriano a la disimilitud entre las larvas del grupo Control y las tratadas con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, se realizó un análisis del porcentaje de similitud (SIMPER) (Tabla 37). En los ejemplares de 23 dpe, más del 50% de las diferencias son aportadas por *P. damselae* subsp. *piscicida* (11,11%) la cual se detectó en otros estadios de desarrollo. Al mismo tiempo *Rhodococcus* y *Shewanella* contribuyeron a esta disimilitud con 12,50% y 20,83% respectivamente. Tras 56 dpe las diferencias en las comunidades bacterianas se atribuyeron a *Shewanella* (17,24%), bacterias no identificadas (17,24%), *Acinetobacter* (10,34%), *Rhodococcus* (8,62%) y *Lactobacillus helveticus* (8,62%). Por último, en el caso de 87 dpe las diferencias se debieron a *Vibrio* (18,18%), *Shewanella* (13,64%), *Candidatus* *Arthromitus* (13,64%) y *Acinetobacter* (12,12%), en tanto que a 119 dpe, el 50,08% de las diferencias entre ambos tratamientos se debieron a la presencia de los grupos relacionados con *Shewanella* (12,70%), *Vibrio* (14,29%) y bacterias no cultivadas (23,81%).

Tabla 36. Identificación de las secuencias contenidas en los clones obtenidos a partir de los fragmentos de ADNr 16S de la microbiota intestinal, porcentaje de similitud de las secuencias en la base de datos GenBank, número de acceso y porcentaje de clones detectados. Ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) a 23, 56, 87 y 119 dpe.

Nº de banda	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje de clones (%)															
				23 dpe				56 dpe				87 dpe				119 dpe			
				Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11		
γ-Proteobacteria																			
1	<i>Acinetobacter</i> sp. MBL 11-0202	98	HM366450	4	5	5	1	5	1	5	1	4	0						
2	<i>Acinetobacter</i> sp. CmNA3	99	HM352317	4	3	6	4	5	5	1	2	5	5						
3	<i>Allivibrio</i> sp. SW5-1	98	FR744854	4	0	4	1	4	5	6	5	5	5						
4	<i>Enterobacter</i> sp. 11H	97	HM803943	8	6	5	4	6	6	5	6	5	6						
5	<i>Enterobacter</i> sp. CC-SN15-5	99	EU596390	1	4	5	6	1	1	5	3	3	3						
6	<i>Halomonas</i> sp. AMP12	97	HM104378	8	5	5	1	4	1	8	4	4	4						
7	<i>Klebsiella</i> sp. PG4-2	97	AB277851	4	1	6	5	5	0	2	0	0	0						
8	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i> pRDA19	98	AJ749800	8	0	1	0	3	1	3	1	3	1						
9	<i>Pseudomonas</i>	99	IQ766121	8	7	2	4	3	3	6	8	8	8						
10	<i>Pseudomonas</i> sp. FG-12b	99	JF724071	4	4	4	3	5	0	2	0	0	0						
11	<i>Pseudomonas</i> sp. Iso-13	95	KC768739	0	2	4	0	4	5	3	2	2	2						
12	<i>Pseudomonas</i> sp. Ant-4	98	HF678977	1	0	5	4	1	0	2	0	0	0						
13	<i>Pseudomonas acephalitica</i> Ind01	99	AM407893	0	4	0	1	0	3	0	4	4	4						
14	<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5329	95	JQ974027	0	2	0	2	3	0	4	0	0	0						
15	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	98	JX415533	0	7	0	6	0	4	0	3	3	3						
17	<i>Shewanella</i> ANA	99	CP00046	0	8	0	4	0	5	0	5	5	5						
18	<i>Vibrio</i> sp. DMS01	97	FJ463236	0	0	4	1	5	5	0	0	0	0						
19	<i>Vibrio campbelli</i> HNS034	99	JN128268	2	2	1	1	5	6	6	6	6	6						
20	<i>Vibrio natriegens</i> 01/252	98	AJ874353	1	0	0	0	0	5	0	5	0	5						
21	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> qdfsVp001	98	JN108879	0	2	0	1	0	1	0	0	0	0						
22	<i>Vibrio</i> sp. Pelg0901	98	JF330909	0	6	0	5	0	5	0	5	0	4						

Tabla 36 (continuación)

Nº de banda	Identificación	Similitud (%)	Nº acceso Genbank	Porcentaje de clones (%)							
				23 dpe		56 dpe		87 dpe		119 dpe	
				Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11	Control	Pdp11
Actinobacteria											
23	<i>Rhodococcus erythropolis</i> H11	99	EF204435	8	0	6	5	3	2	5	5
24	<i>Rhodococcus</i> sp. TM1	98	AY642534	2	1	7	2	4	0	1	0
Firmicutes											
25	<i>Anoxybacillus</i> sp. D503	97	FJ430046	0	0	2	1	6	3	0	0
26	<i>Anoxybacillus</i> sp. K.b-8 no cultivada	97	HM031453	2	0	2	2	4	5	5	2
27	<i>Brevibacillus paravebris</i> DYJK58	98	JX415533	4	6	4	2	3	3	2	4
28	<i>Candidatus</i> Arthromitus sp. SFB-rat-Yit	99	NR074540	0	0	2	2	0	4	0	2
29	<i>Candidatus</i> Arthromitus sp. SFB-rat-Yit	99	NR074545	5	0	3	2	0	4	0	2
30	<i>Candidatus</i> Arthromitus	98	D86303	0	0	0	0	0	2	0	1
31	<i>Geobacillus</i> sp. V1W70BlkII	98	FN556447	3	3	6	3	4	0	4	0
32	<i>Lactobacillus helveticus</i> GIMC23:KSN	98	JF728275	0	5	0	5	0	2	0	1
Mollicutes											
33	<i>Mycoplasma microti</i> IL371	98	FJ609188	4	5	4	2	0	0	0	2
34	<i>Mycoplasma</i> sp Kb.1 no cultivada	99	HM031446	4	0	3	3	1	1	2	8
Bacterias no identificadas											
35	Bacteria marina B37	96	AB607159	8	7	2	4	3	3	6	8
36	Bacteria A119	98	HQ332151	3	4	1	5	4	1	4	2
37	Bacteria PJ-35	95	KF146331	0	1	0	2	3	5	6	0
38	Bacteria R4J7L4_B3 no cultivada	95	GQ467872	0	0	0	2	3	0	4	0
39	Bacteria ncd89b06c1 no cultivada	98	HM256348	0	0	1	4	3	3	3	1
40	Bacteria BR01AD06 no cultivada	98	DQ857141	0	0	0	0	0	4	0	1

Tabla 37. Análisis SIMPER para identificar la contribución de cada grupo bacteriano en la disimilitud total de la microbiota de *S. senegalensis* alimentados con una dieta control (Control) y *Artemia* enriquecida con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Pdp11) a 23, 56, 87 y 119 dpe. Los valores se corresponden a porcentajes de disimilitud de los grupos. Los valores superiores al 10% se han representado en negrita.

Grupos bacterianos	Control-Pdp11			
	23 dpe	56 dpe	87 dpe	119 dpe
<i>Acinetobacter</i>	0	10,34	12,12	1,58
<i>Alliivibrio</i>	5,55	5,17	1,51	1,58
<i>Enterobacter</i>	1,38	0	0	3,17
<i>Halomonas</i>	4,16	6,89	4,54	1,58
<i>Klebsiella</i>	4,16	1,72	7,57	3,17
<i>Photobacterium</i>	11,11	1,72	3,03	3,17
<i>Pseudomonas</i>	8,33	1,72	6,06	0
<i>Shewanella</i>	20,83	17,24	13,64	12,70
<i>Vibrio</i>	9,77	6,89	18,18	14,29
<i>Anoxibacillus</i>	2,77	1,72	3,03	4,76
<i>Brevibacillus</i>	2,77	3,44	1,51	6,34
<i>Geobacillus</i>	0	5,17	6,06	6,34
<i>Lactobacillus</i>	6,94	8,62	3,03	1,58
<i>Candidatus Arthromitus</i>	6,94	0	13,64	6,34
<i>Rhodococcus</i>	12,5	8,62	6,06	1,58
<i>Mycoplasma</i>	2,77	3,44	0	7,93
Bacterias no identificadas	0	17,24	0	23,81

6 DISCUSIÓN

“Ciencia es todo aquello sobre lo cual siempre cabe discusión”

J. Ortega y Gasset

6. DISCUSIÓN

1. Evaluación del efecto ejercido por *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

1.1. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 ejerce un efecto de modulación sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*.

Se ha observado una modulación diferencial de la microbiota intestinal de *S. senegalensis* producida por *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13, que indujeron cambios diferentes en los patrones de bandas de DGGE con respecto al tratamiento Control. Este efecto sobre la microbiota también se ha demostrado con otros probióticos, como es el caso de cepas de bacterias ácido lácticas y de *Bacillus* sp., administrados a diferentes especies acuícolas (Balcázar y col., 2008), como el mero, *Epinephelus coioides* (Sun y col., 2010), trucha arcoiris (*Oncorhynchus mykiss*) (Bagerhi y col., 2008; Merrifield y col., 2009a, b; Nikoskelainen y col., 2003); langostino blanco (*Litopenaeus vannamei*) (Liu y col., 2010) y la carpa común, *Cyprinus carpio* (Nayak y col., 2007).

Los valores de los índices ecológicos obtenidos dan una visión de la funcionalidad del ecosistema y de su estabilidad como consecuencia de la influencia de las especies y grupos que lo conforman (Bell y col., 2005; Griffiths y col., 2001). En este estudio, los índices ecológicos analizados mostraron valores de diversidad (H') similares en la microbiota de los individuos alimentados con la dieta suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 y el grupo Control, mientras que en los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 se obtuvo una reducción significativa de la misma. Estudios llevados a cabo con otras especies acuícolas también han mostrado resultados parecidos en función del probiótico ensayado (Cerezuela y col., 2012; Ferguson y col., 2010; Sun y col., 2012; Yang y col., 2011). Se ha observado que cuanto más alta es la diversidad microbiana, mayor es su capacidad para mantener la funcionalidad de los ecosistemas, ya que permite la adaptación de estos ante las condiciones cambiantes. La coexistencia de una variedad de especies proporciona una mayor garantía de que alguna de ellas sea capaz de sustituir y realizar las funciones de aquellas que hayan desaparecido (Wittebolle y col., 2008).

La secuenciación de las bandas predominantes de los patrones de DGGE mostró que el grupo de γ -Proteobacterias fue el más abundante. La administración a los ejemplares de *S. senegalensis* de las dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 indujo un incremento en el número de especies pertenecientes al género *Shewanella*, y una disminución de la presencia de representantes del género *Vibrio*. El género *Shewanella* incluye especies que se encuentran en medios marinos, así como en el intestino de peces cultivados sanos como la trucha arcoiris (*O. mykiss*), salmón común (*S. salar*) y el pez gato (*Ictalurus punctatus*) (Carnevali y col., 2006; Navarrete y col., 2009; Robertson y col., 2000), y también en *S. senegalensis* cuando reciben alimento natural (Martín-Antonio y col., 2007).

Cabe destacar la banda identificada como *S. putrefaciens* Pdp11 en la microbiota intestinal de los individuos alimentados con la dieta suplementada con dicho probiótico. De igual forma, en los patrones de bandas obtenidos para los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 se detectó una banda relacionada con este microorganismo.

Estudios previos relacionaron los cambios detectados en la microbiota intestinal con procesos nutritivos y digestivos del animal hospedador cuando la dieta se suplementa con probióticos (Nayak, 2010; Ray y col., 2012). El intestino es un lugar de tránsito de alimentos. Su superficie es la encargada de la absorción de nutrientes a la sangre y de allí al resto de órganos. En concreto, el hígado, que está implicado en numerosas funciones metabólicas como la detoxificación, digestión y excreción, presenta un papel fundamental en la asimilación lipídica y el control del aporte graso y de glucógeno. Por tanto, la modulación ejercida por *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 sobre la microbiota podría tener efectos sobre la nutrición y el desarrollo de los peces.

1.2. Los cambios inducidos en los lípidos hepáticos por los probióticos ensayados están relacionados con los cambios en la microbiota intestinal

En el presente trabajo se han observado SGR similares o inferiores en los lenguados alimentados con dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13, respectivamente, en comparación con la dieta Control. Estos resultados no coinciden con los presentados por Sáenz de Rodríguez y col., (2009), quienes informaron de una tasa de crecimiento específico mayor en los lenguados alimentados con ambos probióticos, con una dosis idéntica a la empleada en nuestro ensayo (10^9 ufc g⁻¹). Una posible explicación de esta diferencia en el crecimiento podría basarse en la diferente composición del pienso utilizado (55% proteína y 17% lípidos frente a 50% proteína y 22% lípidos utilizados en este ensayo). La temperatura a la que estuvieron sometidos los peces también puede ser determinante, ya que en este estudio la temperatura a la que se cultivaron los individuos fue de 16,6 °C, inferior a la usada en el experimento de Sáenz de Rodríguez y col., (2009), que fue de 21 °C. Esto puede influir en la velocidad de las reacciones metabólicas del animal y repercutir en su crecimiento y aprovechamiento del alimento (Badillo-Zapata y col., 2010). Sin embargo, no pudo establecer una relación entre los valores de SGR obtenidos y los cambios inducidos por los probióticos ensayados en la microbiota intestinal de *S. senegalensis*.

El contenido en proteínas y lípidos totales en el hígado de los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con las dietas suplementadas fue similar al de los lenguados del grupo Control, aunque sí se observó una tendencia a alcanzar valores ligeramente inferiores de proteínas, y superiores de lípidos, en los peces alimentados con las dietas suplementadas con ambos probióticos. Debido a la importancia que los niveles de ácidos grasos tienen en la fisiología de *S. senegalensis* (Borges y col., 2013) se estudió el efecto de los probióticos sobre los niveles de ciertos ácidos grasos en el hígado, órgano implicado en el metabolismo de los mismos. En este caso, se observaron valores significativamente superiores de ácidos grasos de la serie n-3 y n-6, ácidos linolénico (18:3n-3) y linoleico (18:2n-6), en tanto que el contenido en ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) fue significativamente menor en los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13.

El ácido linoleico (18:2n-6) está implicado en la síntesis de triglicéridos y es uno de los precursores de la síntesis de lipoproteínas (Sire y col., 1981), participando en el transporte de ácidos grasos desde el hígado a otros órganos, lo que podría influir en una mejora de la movilidad y disponibilidad de los ácidos grasos cuando los ejemplares reciben los probióticos. Asimismo, el ácido linolénico (18:3n-3), es un compuesto fundamental tanto para la regulación del sistema inmunitario, como para el correcto desarrollo del organismo (Calder y Kew, 2002; Harbige, 2003; Kiron y col., 1995; Ramírez-Santana y col., 2009). Los niveles más elevados de estos ácidos observados en los ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con las dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 podrían estar relacionados con una mejora en el estado de salud del animal, ya que se derivarían las reacciones metabólicas hacia la síntesis de compuestos beneficiosos.

El ACP generó dos factores que acumularon más del 93% de la variabilidad. El primer componente F1, generó un gradiente en el que las altas concentraciones de ácido araquidónico (ARA, 20:4n-6), ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) y omega-3, junto con la concentración de proteínas y la abundancia de las especies microbianas detectadas en los individuos Control, se situaron en el extremo positivo. Mientras, en su extremo negativo, se situaron las variables como el ácido linoleico, linolénico, omega-6 y especies microbianas detectadas en la microbiota de los peces alimentados con *S. baltica* Pdp13. El F2, el gradiente generado estuvo se relacionó con el número de inclusiones lipídicas tanto hepáticas como intestinales, situándose su máximo número en el eje negativo. Sin embargo, en el eje positivo del F2, se encontraron las especies microbianas detectadas en los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11.

En concreto, las bandas 1, 3, 6, 19 y 32 correlacionaron conjuntamente con los ácidos grasos DHA y ARA. Estas bandas se corresponden con especies del género *Shewanella*, y las especies *V. alginolyticus* y *V. penaeicida*, que estaban presentes de forma conjunta sólo en los individuos alimentados con la dieta Control y suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11. La presencia de ciertas especies de *Vibrio* podría explicar los altos niveles de DHA detectados en el hígado de peces alimentados con la dieta Control. Sin embargo, disminuyeron los niveles observados en los peces que recibieron la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, y especialmente los que recibieron la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13. El género *Vibrio* está incluido en el grupo de γ -Proteobacteria que presentan el sistema ácido graso sintasa (*Pfa* sintasa) responsable de la síntesis *de novo* de ácidos grasos altamente poliinsaturados (HUFAs) como el DHA (Dague y col., 2006). Estos HUFAs juegan un papel importante en la nutrición de peces marinos y participan en el mantenimiento de la integridad estructural y funcional de las membranas biológicas (Turner y col., 2003). En contraste con los resultados anteriores, los niveles de omega-6 y de los ácidos linoleico (18:3n-3), linolénico (18:2n-6) y las bandas 26, 27, 30 y 31 correlacionaron de forma negativa con el factor F1. Estas bandas estaban relacionadas filogenéticamente con el género *Shewanella*, entre los que se encuentra *S. baltica*, y estuvieron presentes sólo en los patrones de bandas de DGGE de los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13. Esto podría indicar una asociación entre la presencia de *Shewanella* spp. en la microbiota intestinal y niveles más elevados de omega-6, y de los ácidos linoleico (18:3n-3) y linolénico (18:2n-6) detectados en el hígado de los peces alimentados con esta dieta. Ramírez-Santana y col., (2009) demostraron

el papel regulador del ácido linoleico (18:3n-3) en el sistema inmunitario. Este hecho podría estar relacionado con el efecto inmunoestimulante y la mayor resistencia a las infecciones por *P. damselae* subsp. *piscicida* observadas en ejemplares de *S. senegalensis* que recibieron dietas suplementadas con *S. putrefaciens* Pdp11 y *S. baltica* Pdp13 (Díaz-Rosales y col., 2009; García de la Banda y col., 2010a).

En este estudio se ha observado una reducción significativa en el tamaño y número de inclusiones lipídicas en los hepatocitos y enterocitos de ejemplares juveniles de *S. senegalensis* alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, mientras que este efecto no se observó en aquellos alimentados con la dieta Control o suplementada con *S. baltica* Pdp13. Estos resultados coinciden con los registrados por Sáenz de Rodrigáñez y col., (2009), quienes también observaron un número reducido de inclusiones lipídicas dentro de los enterocitos. Por otra parte, un grupo de bandas presentes únicamente en los individuos alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 correlacionaron positivamente con el componente F2, mientras que la presencia de inclusiones lipídicas en los enterocitos y hepatocitos mostró una correlación negativa con este componente. Estas bandas correspondieron a especies de *Vibrio* y *Shewanella*, entre ellas la perteneciente al probiótico *S. putrefaciens* Pdp11. Los resultados obtenidos relacionaron porcentajes bajos de inclusiones lipídicas en los hepatocitos de peces con niveles altos de ácido linoleico (18:3n-3) alimentados con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11. Esto podría estar relacionado con los efectos lipolíticos demostrados para este ácido (Ide, 2000). Por el contrario, en este estudio se han detectado niveles similares de ácido linoleico (18:3n-3) en el hígado de peces alimentados con la dieta suplementada con *S. baltica* Pdp13 pero asociados a mayor número de inclusiones lipídicas. Estos resultados en los que se ha podido demostrar la diferente relación entre la microbiota intestinal de los peces alimentados con las dietas probióticas y los niveles de inclusiones lipídicas concuerdan con las observaciones de Semova y col., (2012). Estos autores concluyeron que la influencia de la composición microbiana del intestino en la absorción de grasas y formación de diferentes tipos de inclusiones lipídicas afecta al número y tamaño de las mismas. Este punto es importante, ya que un hígado graso puede ser la manifestación de una dieta no equilibrada (Caballero y col., 1999; Robaina y col., 2008). De hecho, las primeras dietas comerciales empleadas para el engorde de ejemplares de *S. senegalensis*, con una composición en lípidos superior al 20% contribuyeron en gran medida a la producción de ejemplares con hígados grasos (Borges y col., 2009; Rueda-Jasso y col., 2004).

En resumen, en este estudio se ha podido demostrar la capacidad de modulación de la microbiota intestinal de *S. senegalensis* por parte de los probióticos ensayados, la cual es dependiente de la especie probiótica. Esta modulación se ha asociado con cambios en los niveles de ciertos ácidos grasos, así como con el nivel de inclusiones lipídicas en enterocitos y hepatocitos de *S. senegalensis*.

2. Evaluación de la forma de administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Diversos autores han propuesto que distintas formas de administración de los probióticos, tales como la microencapsulación o inclusión de las células en microesferas, por ejem-

plo de alginato, proporcionan una protección adicional hasta llegar a la zona de actuación (Chávarri y col., 2010; Sandoval-Castilla y col., 2010; Semyonov y col., 2010; Zhang y col., 2016). En el caso concreto de *S. putrefaciens* Pdp11 hay estudios que han administrado el probiótico liofilizado y sin liofilizar, con y sin alginato (Díaz-Rosales y col., 2009; García de la Banda y col., 2010a, b; Sáenz de Rodrigáñez y col., 2009; Varela y col., 2010) o inactivado por calor (Díaz-Rosales y col., 2006; Salinas y col., 2006). Sin embargo, en ninguno de ellos se ha evaluado el efecto que produce sobre la microbiota intestinal, y la capacidad de colonización del probiótico administrado.

2.1. La administración del probiótico liofilizado induce una menor diversidad en la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Los resultados obtenidos mostraron una similitud mayor en la microbiota de los ejemplares alimentados con las dietas suplementadas con alginato y con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (liofilizado o no) frente al grupo Control. Esto sugiere que la adición del probiótico y/o alginato produce una mayor homogeneización de la microbiota intestinal.

El probiótico administrado conjuntamente con alginato sódico que, además de servir de soporte, posee propiedades prebióticas estimulando el crecimiento de numerosas poblaciones bacterianas existentes en el intestino (Wang y col., 2006). De los resultados obtenidos se desprende que la adición de alginato redujo la diversidad respecto a la observada en el grupo Control. Este resultado contrasta con los obtenidos por Merrifield y col., (2011c), quienes informaron de que la adición de ácido algínico a la dieta de juveniles de tilapia (*O. niloticus*) no afectó a los parámetros ecológicos microbianos de diversidad y riqueza. En el caso que nos ocupa, la reducción en la diversidad fue más acusada cuando se adicionaron conjuntamente el alginato y células liofilizadas del probiótico; sin embargo, los valores de diversidad no variaron de forma significativa respecto a los valores obtenidos con la adición del alginato, cuando este se suministró conjuntamente con células del probiótico sin liofilizar.

Como ya se ha dicho anteriormente, la estabilidad de un ecosistema está influenciada por sus especies y grupos funcionales. Además, la diversidad juega un papel determinante en la función del mismo. Bajo este razonamiento, la reducción en la diversidad del ecosistema bacteriano intestinal de los peces que recibieron las dietas con alginato y probiótico, especialmente cuando éste se administraba liofilizado, podría suponer un efecto negativo frente a cambios que se podrían producir, como se ha podido ver en el caso de algunos microorganismos como *Bacillus subtilis* (Cerezuela y col., 2012e). Si bien, se puede destacar que los valores de riqueza (R) no mostraron diferencias significativas y los de habitabilidad (Rr) fueron superiores en todos los casos a 30, que corresponden a sistemas habitables por un amplio número de especies filogenéticamente diferentes (Marzorati y col., 2008). Además, son numerosos los estudios que han demostrado que los efectos inducidos sobre distintos peces por el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 son beneficiosos tanto cuando se suministra como células liofilizadas (Díaz-Rosales y col., 2009; García de la Banda y col., 2010b; Sáenz de Rodrigáñez y col., 2009), como sin liofilizar (García de la Banda y col., 2012; Lobo y col., 2014a, b), e incluso cuando los peces eran sometidos a situaciones de estrés (Varela y col., 2010).

Los resultados obtenidos en este estudio indican la existencia de una reducción de la diversidad, por tanto una cierta dominancia, aunque normalmente esos cambios se producen entre especies microbianas muy relacionadas y que fácilmente podrían sustituirse y asumir la función desempeñada por ellas.

Al finalizar el periodo de alimentación con las dietas experimentales, el análisis SIMPER mostró que la mayor contribución a la disimilitud de la microbiota de los peces Control se debió a bandas relacionadas con especies del género *Vibrio*. La adición de alginato en la dieta indujo un incremento de las bandas de DGGE relacionadas con el grupo Harveyi, tales como *V. harveyi*, *V. parahaemolyticus*, *V. alginolyticus* y *V. rotiferianus*, en comparación con los peces Control, en los que sólo se detectaron bandas relacionadas con *V. harveyi*. El grupo Harveyi incluye a *V. harveyi*, *V. campbellii*, *V. parahaemolyticus*, *V. rotiferianus*, *V. alginolyticus*, *V. natriegens* y *V. mytili* (Sawabe y col., 2007). Estas especies comparten una elevada homología fenotípica y genotípica (Cano-Gómez y col., 2009; Pascual y col., 2009). Algunos de sus miembros son importantes patógenos acuícolas, como es el caso de *V. alginolyticus* (Balebona y col., 1998; Gómez-León y col., 2005), *V. parahaemolyticus* (Cai y col., 2006; Zorrilla y col., 2003) y los anteriormente citados *V. harveyi* (Arijo y col., 2005a; Zorrilla y col., 2003) y *V. campbellii*. En contraste, cuando la dieta se suplementó conjuntamente con alginato y células del probiótico, liofilizadas o no, se redujo la presencia de este grupo en comparación con lo descrito cuando se adicionaba sólo el alginato.

2.2. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 tiene capacidad de colonizar el intestino de los juveniles de *Solea senegalensis*

Para que los microorganismos probióticos pudieran seguir manifestando sus efectos en el hospedador, deberían ser capaces de sobrevivir y colonizar en el tracto gastrointestinal del mismo (De Champs y col., 2003; Kaila y col., 1995). Esta relación entre colonización y efecto del probiótico también se ha descrito para otros probióticos administrados a peces (Sun y col., 2013; Tinh y col., 2008). Hay datos que indican que la aplicación de los probióticos en la dieta de los peces no implica su posterior presencia en el tracto gastrointestinal de los individuos a los que se les ha administrado, una vez finalizada su aplicación. Pese a los numerosos trabajos que describen los efectos beneficiosos de la incorporación de probióticos en la dieta de peces, son escasos los trabajos que determinan la duración de dichos efectos tras la finalización de su aplicación, sobre todo en lo que concierne a la microbiota intestinal. Por ello, en este estudio se ha analizado el efecto de la administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal de *S. senegalensis* que ha dejado de recibir la dieta con *S. putrefaciens* Pdp11 liofilizado o no.

Las bandas relacionadas con el género *Shewanella* se detectaron en los patrones de bandas de DGGE de los ejemplares que habían recibido las dietas suplementadas con el probiótico tanto liofilizado como no. Sin embargo, si bien en ambos casos se detectó a los 15 días una banda relacionada con *S. putrefaciens* Pdp11 en los peces que habían recibido el probiótico a los 30 días de la suspensión sólo se detectó esta banda en los ejemplares alimentados con la dieta suplementada con el probiótico sin liofilizar. No obstante, el no detectar el probiótico en el tracto gastrointestinal a los 30 días de la suspensión de los tratamientos no indica nece-

sariamente su ausencia, sino que su presencia podría estar por debajo del 1% del total de la microbiota, que es el límite de detección de la DGGE utilizada en estos estudios (Fromin y col., 2002). Estos resultados confirman la capacidad de *S. putrefaciens* Pdp11 para colonizar el intestino del lenguado senegalés anteriormente descrita en estadios larvarios y de alevines de *S. senegalensis* (Lobo y col., 2014b). Por todo ello, las células de *S. putrefaciens* Pdp11 en forma no liofilizada se consideran como la forma de administración más favorable.

3. Estudio de la modulación de la microbiota intestinal y de la transcripción génica en hígado de ejemplares de *Solea senegalensis* tratados con oxitetraciclina y una dieta suplementada con el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11

La mayoría de los microorganismos que habitan el tracto intestinal juegan un papel fundamental en la nutrición y fisiología del hospedador (Denev y col., 2009; Nayak y col., 2010). Los antimicrobianos y/o antibióticos son herramientas muy empleadas en acuicultura, pero que pueden afectar a la microbiota intestinal de diversos modos (Jernberg y col., 2010), alterando la homeostasis intestinal. Estudios llevados a cabo en humanos indican que el equilibrio normal entre el hospedador y su microbiota puede protegerse, e incluso restaurarse, con la administración de probióticos (Sanders, 2008; Wolker, 2008). Sin embargo, estos trabajos son escasos, si no nulos, en el caso de los peces. Es por ello, que se planteó la cuestión de si *S. putrefaciens* Pdp11 podía amortiguar los efectos que pueden tener los antibióticos sobre *S. senegalensis*.

Los antibióticos, entre ellos la oxitetraciclina, son frecuentemente empleados en la industria acuícola para tratar y prevenir enfermedades (Cabello, 2006, 2013). Concretamente, la oxitetraciclina ha sido utilizada desde hace décadas para combatir las enfermedades bacterianas más comunes. Y si bien, hay estudios que analizan sus efectos sobre diferentes aspectos de la fisiología de las especies acuícolas (Guardiola y col., 2012; Haque y col., 2014; Kashem y col., 2014; Rogstad y col., 1991; Serezli y col., 2005), la información referente a su efecto sobre la microbiota intestinal de los peces es muy escasa.

3.1. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 atenúa el efecto de la OTC sobre la diversidad de la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

El análisis de los patrones de bandas de DGGE mostró un cambio en la composición de la microbiota intestinal en todos los tratamientos. Por otro lado, los valores de riqueza específica (R), diversidad (H') y habitabilidad (Rr) de la microbiota intestinal de peces tratados con OTC disminuyeron en comparación con los valores observados en los peces Control, indicando que el antibiótico produjo una serie de cambios ecológicos en las comunidades bacterianas. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Navarrete y col., (2008), quienes observaron en salmones atlánticos (*S. salar*) tratados con el antibiótico OTC produjo cambios en los perfiles de DGGE de su microbiota intestinal y, una menor diversidad filogenética.

Por el contrario, cuando los peces se trataron simultáneamente con OTC y el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11), los efectos negativos inducidos sobre la microbiota

intestinal por el antibiótico se atenuaron, aumentando los valores de diversidad (H'), riqueza (R) y habitabilidad (Rr) obtenidos para el grupo Control y tratados con OTC. Estos resultados muestran que el probiótico puede estar influyendo en el desarrollo de un sistema capaz de albergar más especies, lo que garantizaría la funcionalidad del sistema (Witteboille y col., 2008).

En todos los tratamientos, la mayor parte de los grupos secuenciados pertenecieron a la clase γ -Proteobacteria y dentro de este grupo, al género *Vibrio*, especialmente en individuos tratados sólo con OTC. La aplicación del probiótico junto con el antibiótico aumentó el número de especies de *Vibrio* con respecto a las tratadas con OTC pero, disminuyó la representación de las especies patógenas, *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*. Sin embargo, los peces que recibieron la dieta junto con OTC y el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (OTC+Pdp11) mostraron una menor intensidad en las bandas correspondientes con las especies del género *Vibrio*, en comparación con la microbiota intestinal de individuos sometidos a los tratamientos Control y OTC. Otras bandas predominantes se identificaron con los géneros *Lactobacillus* y *Shewanella*. Estudios previos observaron capacidad antagonista en ciertas especies de *Lactobacillus* frente a otras de *Vibrio* (Chabrillón y col., 2006; Koga y col., 1998). Likotraftiti y col., (2013) describieron que en *Lactobacillus fermentum*, especie bacteriana presente en los ejemplares estudiados, se ha descrito actividad antimicrobiana. Por otro lado, especies pertenecientes al género *Shewanella* también mostraron un efecto antagonista *in vitro* frente a especies de *Vibrio* (Chabrillón y col., 2005a; Shakibazadeh y col., 2012), así como la capacidad de reducir la presencia de este género en la microbiota intestinal de peces como *S. senegalensis*. Estos cambios en la microbiota producidos tanto por la OTC como por la OTC junto con el probiótico pueden tener también efectos a otros niveles fisiológicos.

3.2. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 administrado junto con OTC incrementa la expresión de genes antiapoptóticos

Se analizaron los posibles cambios en la expresión de una serie de genes en *S. senegalensis* relacionados principalmente con la muerte celular o apoptosis, así como con el metabolismo del hierro, tras el tratamiento con OTC y *S. putrefaciens* Pdp11, a nivel hepático, por la gran importancia detoxificadora y metabólica de este órgano.

Se observó un incremento en la expresión del gen NADPH oxidasa en los ejemplares tratados con el antibiótico OTC y con el antibiótico junto con el probiótico (OTC + Pdp11), en comparación con los ejemplares alimentados con la dieta Control. La transcripción de este gen fue significativamente superior en los peces que fueron tratados sólo con OTC, en comparación con aquellos tratados conjuntamente con el antibiótico y el probiótico. La actividad NADPH oxidasa está directamente implicada en la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (De Minicis y Brenner, 2008; Paik y Brenner, 2011) y en los procesos de estrés oxidativo y muerte celular (Ben Mkadden y col., 2010; Valencia y col., 2013). Por ello, la administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 junto con el antibiótico OTC puede tener un efecto protector sobre los hepatocitos de los ejemplares tratados con el antibiótico.

Otro de los genes estudiados fue la CASPASA6, que codifica una proteína de la familia cisteinil-aspartato proteasas, que está implicada en los procesos que desencadenan la apop-

tosis inducida por agentes causantes de estrés (Olsvik y col., 2010; Song y col., 2012). En nuestro estudio, se detectó un incremento significativo de la transcripción de este gen en los ejemplares que recibieron tratamiento sólo con OTC. Por el contrario, los individuos tratados con OTC + Pdp11 mostraron niveles de expresión de este gen inferiores no sólo a la de los ejemplares tratados únicamente con OTC sino también a los del tratamiento Control. Al igual que para el caso de la NADPH oxidasa, los resultados parecen mostrar que el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 es capaz de disminuir el daño relacionado con la administración del antibiótico.

Se ha demostrado que cambios en la composición de la microbiota intestinal pueden inducir la translocación de microorganismos, o de sus productos, en el sistema de circulación portal, causar daño tisular en el hígado, y por tanto, producir disfuncionalidad en dicho órgano (Szabo y col., 2011). El sistema circulatorio portal recibe sangre con sustancias procedentes del sistema digestivo capaces de activar ciertas funciones hepáticas (Cesaro y col., 2011). Por otro lado, el hígado también puede afectar a algunas funciones intestinales a través de la secreción de bilis en el lumen intestinal (Normann y Pirlich, 2008). Todo ello evidencia la fuerte relación existente entre la microbiota intestinal y ciertas enfermedades hepáticas (Cesaro y col., 2011; Dhiman, 2013; Mouzaki y col., 2013).

El ACP llevado a cabo demostró la existencia de una asociación entre la microbiota intestinal y la expresión de ciertos genes que estaban correlacionados positivamente con el factor principal o F1, factor que separó claramente a los ejemplares del tratamiento Control de aquellos tratados con OTC + Pdp11. El eje F1 generado a partir del ACP parece mostrar un gradiente relacionado con la integridad *vs* daño celular, al disponerse los genes relacionados con la apoptosis en el extremo negativo y, aquellos vinculados a procesos de protección celular, en el extremo opuesto. Las muestras tratadas con OTC más el probiótico se segregaron y localizaron la parte positiva de este eje, a diferencia de las muestras Control y, de aquellas tratadas sólo con el antibiótico. Estos resultados parecen estar acordes con los obtenidos por Quiao y col., (2013), quienes demostraron la existencia de relaciones entre la microbiota intestinal y el estrés oxidativo. El F2 separó del resto aquellos especímenes que recibieron únicamente el antibiótico. De este modo, el OTC produce la aparición de una serie de microorganismos en la microbiota intestinal de los ejemplares de *S. senegalensis* que están asociados a la sobreexpresión de genes como NADPH oxidasa y CASPASA6 en el hígado, mientras en los ejemplares tratados con OTC y el probiótico *S. Putrefaciens* Pdp11 fomentaron especies de *Lactobacillus* para las cuales se ha demostrado que presentan la capacidad de producir moléculas antioxidantes y reducir el estrés oxidativo (Dijkstra y col., 2014; Goyal y col., 2013). Así mismo, se detectó una fuerte relación entre la transcripción de genes como IGF- β , NKEF, HSP70 y GP96 y las especies detectadas en los ejemplares tratados con OTC y el probiótico *S. Putrefaciens* Pdp11.

El gen NKEF codifica para las peroxiredoxinas, una familia de enzimas antioxidantes que protegen y reparan las células afectadas por daño oxidativo (Rhee y col., 2005), y por tanto de la muerte celular (Ishii y col., 2012). En otros trabajos ya se había descrito la existencia de la regulación de este gen bajo tratamientos con LPS, o con bacterias, virus o parásitos (Bethke y col., 2012; Chen y col., 2009; Loo y col., 2012), sugiriendo el papel primario en la respuesta de la inmunidad innata frente a agentes bacterianos y víricos (Esteban y col., 2013).

El gen IGF- β codifica para la proteína que recibe el mismo nombre, la cual es un potente inhibidor de la apoptosis (Jung y col., 1996; Matthews y Feldman, 1996). Esta actividad también fue demostrada por Ashare y col., (2008), reduciendo los efectos de la septicemia que presentaban los ratones de experimentación, con una mejor eliminación bacteriana en el hígado debido posiblemente a una menor apoptosis de las células Kupffer (Hunninghake y col., 2010). Estudios previos en modelos de daño hepático detectaron que tras terapia con la proteína IGF- β disminuía la translocación bacteriana a través del tracto digestivo (Scopa y col., 2010). Por otra parte, se ha observado en humanos una correlación inversa entre los niveles de bacterias intestinales y los niveles de IGF- β , lo que podría indicar la existencia de translocación bacteriana cuando los niveles de la proteína IGF- β disminuyen (Hunninghake y col., 2010).

Está demostrado que la exposición celular a condiciones ambientales desfavorables para el organismo causa un estrés oxidativo en el retículo endoplasmático (Hernández-Gea y col., 2013), lo que provoca un plegamiento proteico anómalo y la inducción de la expresión de proteínas de choque térmico (HSP), como HSP70 y HSP90AB, que ayudan a corregir estos plegamientos incorrectos (Zeng y col., 2014). En este estudio no se observó la alteración de la expresión de genes que codifican para HSP70 y HSP90AB en el hígado de peces tratados con OTC. Por el contrario, los peces tratados con OTC+Pdp11 mostraron una sobreexpresión del gen que codifica para la HSP70. La familia de las HSP70 es la llave para el mantenimiento de la homeostasis proteica y de las vías de señalización (Mayer y Bukau, 2005). HSP70 regula los eventos celulares fundamentales y promueve la supervivencia de células expuestas a diferentes tipos de estrés (Jiang y col., 2012; Sung y col., 2013). En este contexto, la sobreexpresión de HSP70 se ha relacionado con una reducción o inhibición de la apoptosis en diferentes tipos celulares (Zhao y col., 2014), lo que puede estar relacionado con la contribución de HSP70 a las defensas antioxidantes (Azad y col., 2011; Guo y col., 2007).

La expresión del gen GP96 se incrementó en el hígado de los peces que recibieron el tratamiento OTC+Pdp11. El producto del gen GP96 es una proteína de choque térmico que se localiza en el retículo endoplasmático (ER). Ésta interactúa específicamente con receptores de la superficie de células presentadoras de antígeno e induce inmunidad cuando se libera durante procesos de estrés y de necrosis celular (Schreiter y col., 2005). Distintos estudios han demostrado el papel que juegan las HSP en la regeneración del hígado (Shi y van Kaer, 2006) y en el caso concreto de la GP96, Mrakovčić-Šutić y col., (2008) demostraron un incremento de la expresión de genes GP96 asociado con la regeneración del hígado en ratones que habían sido sometidos a una hepatectomía parcial. Así mismo, también se ha observado que está implicada en procesos inmunorreguladores (Multhoff, 2006; Warger y col., 2006).

Igualmente los peces tratados con OTC y Pdp11 mostraron incrementos significativos de la expresión del gen GPx, el cual codifica para la proteína glutatión peroxidasa. Sin embargo, a diferencia de lo observado con los genes anteriores, la correlación entre la transcripción de este gen y la composición de la microbiota intestinal no está clara. GPx, como la catalasa y la superóxido dismutasa, regula el estatus oxidativo celular. Nuestros resultados coinciden con otros que también muestran un incremento en la expresión de este gen en el riñón cefálico de ejemplares de *Gadus morhua* y *Epinephelus coioides*, que recibieron dietas suplementadas con *Pseudomonas* y *Psyrhobacter* (Lazado y col., 2010) y *Lactobacillus plantarum* (Son y col.,

2009), respectivamente. Podría considerarse que una mayor transcripción de este gen tendría un impacto protector sobre los efectos dañinos de las especies reactivas de oxígeno (ROS), como es prevenir la peroxidación lipídica (Barata y col., 2005). Estos resultados pueden corroborar la capacidad anti-oxidativa de *S. putrefaciens* Pdp11 que mostraron autores como Esteban y col., (2014), así como la potencial reducción de la apoptosis celular.

El hierro es un elemento esencial para los organismos que en condiciones fisiológicas está asociado con proteínas para prevenir el daño tisular. Su concentración debe ser regulada, ya que alteraciones de la homeostasis del hierro están involucradas, entre otras cosas, en la aparición de enfermedades infecciosas (Georgopoulou y col., 2014). En este estudio, se ha observado la sobreexpresión del gen TF en el hígado de individuos tratados con OTC. Este gen codifica para la proteína transferrina, un quelante de hierro implicado en mecanismos de defensa (Caipang y col., 2009; Palaksha y col., 2008). Esta sobreexpresión puede estar también relacionada con la actividad quelante de hierro que el propio antibiótico posee, al igual que otros antibióticos de la familia de las tetraciclinas (Grenier y col., 2000). De este modo, el incremento de la transcripción del gen TF podría estar indicando una adaptación del sistema en respuesta a la reducción de la disponibilidad de hierro en las células hepáticas, lo cual puede inducir la apoptosis celular, como ha sido demostrado en distintos estudios (Cozzi y col., 2003; Greene y col., 2012; Simonart y col., 2002).

La administración simultánea de antibiótico y probiótico (OTC + Pdp11) también induce una sobreexpresión del gen TF, si bien inferior a la observada en los peces tratados únicamente con OTC. Por otro lado, la hepcidina (HAMP1) es un péptido que está presente en el suero pero que es sintetizado principalmente por los hepatocitos, siendo clave en la homeostasis del hierro en el organismo (Beaumont, 2004; Loreal y col., 2006). Este incremento de la transcripción del gen HAMP1 observada en el grupo tratado con OTC + Pdp11 puede estar relacionado con un menor nivel de expresión del gen CASPASA6, relacionado a su vez con los procesos apoptóticos. Por el contrario, los niveles de expresión superiores del gen CASPASA6 detectados en los peces tratados con OTC se relacionaron con una disminución de la expresión del gen HAMP1. Estos resultados apoyan aquellos estudios en los que en los cardiomiocitos humanos el silenciamiento de la hepcidina da lugar a procesos de apoptosis inducida por hierro (Hsieh y col., 2014).

La hepcidina es un péptido multifuncional involucrado también en funciones inmuno-moduladoras como péptidos antimicrobianos (De Domenico y col., 2010; Rajanbabu y col., 2010). Varios autores han demostrado que los niveles de hepcidina se incrementan de forma significativa en peces después de las infecciones bacterianas (Bo y col., 2011; Martín-Antonio y col., 2009; Pereiro y col., 2012). En peces como *S. maximus* se ha propuesto la existencia de al menos dos tipos de hepcidinas, cuya expresión se veía afectada por infecciones por patógenos, si bien la tipo 1 se sobreexpresaba después de la sobrecarga de hierro (Pereiro y col., 2012). La hepcidina, HAMP1, se ha descrito en *S. senegalensis* y su transcripción se ve reducida en los procesos de estrés (Salas-Leitón y col., 2010; 2012). Desde este punto de vista, la sobreexpresión detectada en este estudio puede considerarse como una potencial actividad inmunoestimuladora ejercida por el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, principalmente si se considera la ausencia de patogenicidad y los beneficios producidos por este microorganismo sobre la inmunología y fisiología de *S. senegalensis* (Lobo y col., 2014a, b; Tapia-Paniagua y col., 2012).

En resumen, los resultados obtenidos en este estudio han demostrado que la administración del antibiótico OTC produce un incremento en la expresión de los genes relacionados con la apoptosis, en tanto que la administración conjunta de OTC y el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 induce un incremento en la transcripción de genes relacionados con los efectos antiapoptóticos y la regulación del estrés oxidativo. Finalmente, se ha observado una fuerte modulación de la microbiota intestinal observada tanto en los peces que recibieron tratamiento sólo con OTC como en los que lo recibieron conjuntamente con *S. putrefaciens* Pdp11. Mientras que la administración de OTC influyó disminuyendo el número de especies pertenecientes a gamma proteobacterias, tras la adición del probiótico se detectaron nuevos grupos microbianos así como aumentaron las especies de los ya existentes.

4. Estudio de la modulación ejercida por el probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 sobre la microbiota intestinal y la transcripción génica en ejemplares de *Solea senegalensis* sometidos a estrés

Las condiciones impuestas por la industria acuícola provoca en numerosas ocasiones que los peces se vean sometidos a elevadas densidades de cultivo en los tanques. Existen datos que relacionan factores de estrés social, como la sobrepoblación, con una inmunosupresión en los individuos (Tort, 2011), y alteraciones del tracto gastrointestinal (Bailey y col., 2011).

Es por este motivo que se planteó como un objetivo de este estudio analizar los cambios producidos en el tracto gastrointestinal y en la expresión génica relacionada con la inmunidad de *S. senegalensis* cultivado bajo altas densidades así como el efecto que sobre esos cambios podría ejercer el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11.

4.1. La administración de *S. putrefaciens* Pdp11 redujo la mortalidad de *S. senegalensis* afectados por patógenos *Vibrio harveyi* y *Vibrio parahaemolyticus*

Aranguren y col., (2002) y Mauri y col., (2011) demostraron la relación entre el aumento de la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas en los peces con la presencia de procesos de estrés para el animal. En consonancia con estos trabajos, en la fase inicial de nuestro estudio, los individuos de los grupos sometidos a alta densidad, CHD y PHD, mostraron los típicos síntomas de vibriosis, como oscurecimiento corporal, úlceras necróticas y descamación de la piel (Austin, 2010), no mostrando síntomas de enfermedad aquellos que se cultivaban a densidades normales. Además, y asociado con esta infección, se observaron en los grupos mantenidos a elevadas cargas de individuos tasas de mortalidad que tuvieron su mayor incidencia (80%) a los 30 días en el grupo CHD, mientras que en el grupo PHD la mortalidad no superó el 3%.

Tras realizar un análisis bacteriológico de las muestras tomadas a partir de las úlceras, hígado y riñón de los individuos infectados, se aislaron e identificaron posteriormente dos especies descritas como patógenas para *S. senegalensis* como fueron *V. harveyi* y *V. parahaemo-*

lyticus (Arijo y col., 2005; Zorrilla y col., 2003).

4.2. El probiótico reduce la presencia de *Vibrio harveyi* en la microbiota intestinal de peces cultivados a alta densidad

Como ya se ha comentado anteriormente, *S. putrefaciens* Pdp11 posee capacidad de modular la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, que se confirmó nuevamente en este diseño experimental. De esta forma, se ha observado que la administración del probiótico a la dieta redujo la presencia de miembros del grupo Actinobacteria, de la especie *P. damsela* subsp. *piscicida* y de aquellos incluidas en el grupo Harveyi.

A los 30 días del inicio del experimento, y coincidiendo con la máxima mortalidad observada en el grupo CHD, la microbiota intestinal de estos ejemplares mostró altos porcentajes de clones relacionados con *V. parahaemolyticus* y *V. harveyi*. En comparación con los peces del grupo CHD, en el grupo PHD se detectó una menor diversidad y número de clones relacionados con el grupo Harveyi, incluso no llegando a detectarse la especie *V. harveyi* en ningún individuo. Por otro lado, es de destacar la presencia de *V. ichthyenteri* y *V. scophthalmi* en el grupo PHD, conocidos productores de sideróforos e importantes candidatos a usarse como probióticos (Sugita y col., 2012).

Pese a que se detectó claramente el efecto de la dieta probiótica sobre la microbiota intestinal de *S. senegalensis*, no se detectaron clones relacionados con *S. putrefaciens* Pdp11 en los peces alimentados con la misma. Este resultado no implica la ausencia del probiótico en la microbiota intestinal de los peces tratados, ya que podía estar por debajo del límite de detección de la técnica DGGE, el cual está en el 1% de la abundancia total (Fromin y col., 2002), o bien que el tiempo de administración del probiótico fue inferior al aplicado en los experimentos anteriores.

A los 19 días del inicio del experimento, los ejemplares mantenidos en condiciones de alta densidad mostraron una disminución significativa en la expresión de los genes que codificaban para proteínas implicadas en el sistema inmunitario, sobre todo aquellas relacionadas con la respuesta aguda (C7, HP, HSP70 y NARS) y que tienen un papel directo contra bacterias patógenas, como g-LYZ. Este resultado coincide con los observados por Salas-Leiton y col., (2010), que en ejemplares de *S. senegalensis* cultivados bajo condiciones de sobrepoblación presentaron una acusada reducción en la transcripción de g-LYZ y HSP70. También coinciden con los niveles decrecientes de lisozima plasmática y de actividad del complemento detectada por Costas y col., (2013) en *S. senegalensis*. Nuestros resultados corroboran la evidencia de que el estrés social puede tener un efecto inmunosupresor como propone Tort (2011). En contraste, a los 30 días, los peces del grupo CHD mostraron una sobreexpresión de la mayoría de los genes inmunológicos estudiados, tales como los ya mencionados C7, HP y NARS, y los genes HAMP1, TNF α y NCCRP1.

Hay que tener en cuenta que los peces analizados son los especímenes que sobrevivieron a la infección y que tienen el sistema inmune activado frente al ataque del patógeno. Esto justificaría esta sobreexpresión génica relacionada con la respuesta inmune.

Así, como ya se ha dicho anteriormente, HAMP1 codifica para un péptido antimicrobiano que tiene un papel fundamental en la defensa contra los patógenos. TNF α codifica para un factor protector antiinflamatorio y NCCRP1 a una proteína receptora celular citotóxica no específica, involucrada en la unión al antígeno. Esta sobreexpresión génica coincide con la observada en ejemplares de *S. senegalensis* inoculados con lipopolisacáridos (LPS) según Osuna-Jiménez y col., (2009) y Prieto-Álamo y col., (2009). Por lo tanto, los resultados obtenidos indicaron claramente que los ejemplares del grupo CHD estaban activos frente a una infección microbiana. En contraste, la expresión de estos genes en los ejemplares expuestos a altas densidades de cultivo que recibieron la dieta probiótica (PHD), mostraron unos niveles, en la mayoría de los genes estudiados, muy similares a los mostrados en los individuos cultivados a densidades normales. Esto podría indicar que la administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 proporciona una mayor resistencia al patógeno y una recuperación más rápida de los ejemplares después de la infección, o bien, aumenta la protección frente a la misma.

4.3. La administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 modula cambios en la barrera intestinal de peces sometidos a estrés

La intensidad de los síntomas mostrados por los ejemplares de los grupos CHD, junto con el hecho de que *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* se detectaran a partir de las úlceras de la piel y órganos internos de los individuos de estos grupos podría indicar que la ruta potencial de entrada de los patógenos pudo ser a través de las heridas de la piel, y a partir de ahí, diseminarse a través de la sangre. *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* se han descrito como agentes etiológicos de enfermedades infecciosas capaces de producir úlceras en la piel de *S. senegalensis* (Zorrilla y col., 2003). Sin embargo, también el tracto gastrointestinal se ha descrito como una ruta de entrada importante de los patógenos (Michel y col., 2002; Ringø y col., 2004). De este modo, *V. harveyi* se ha aislado a partir de peces marinos afectados por síndromes gastrointestinales (Liu y col., 2004), y *V. parahaemolyticus* se considera un patógeno intestinal importante (Khouadja y col., 2013; Ritchie y col., 2012). En este contexto, las colonias identificadas a partir de las heridas de la piel y de los órganos internos también se detectaron en la microbiota intestinal de los peces del grupo CHD. Por esta razón, esta ruta tampoco podría descartarse como una vía potencial de entrada de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*.

El estrés induce alteraciones en la barrera intestinal, tales como daños en los enterocitos y cambios en la composición de la microbiota intestinal (Bailey y col., 2011; Olsen y col., 2003, 2005), que facilitan la translocación bacteriana. Este proceso pueden llevarlo a cabo tanto bacterias no patógenas de la propia microbiota, como patógenas, incluyendo algunas especies de *Vibrio* (revisado por Ringø y col., 2007).

En este estudio se han observado cambios en la barrera intestinal, tales como modificaciones de la altura de las microvellosidades, en el diámetro de la luz intestinal, en el número de células caliciformes y en la composición de la microbiota de los ejemplares del grupo experimental CHD. Es sugerente pensar que estos cambios observados podrían haber facilitado la translocación de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* a través de los tejidos intestinales. Además de *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus*, se detectaron *Pseudomonas putida*, *Vibrio campbellii* y *Candidatus Arthromitus* en el intestino de estos peces. *P. putida* es un patógeno

oportunista habitual en acuicultura (Altinok y col., 2006), y algunas cepas de *V. campbellii* se han caracterizado por ser muy virulentas para los organismos acuáticos (Haldar y col., 2011), mientras que otras no son patógenas (Ruwandeeepika y col., 2010). Por último, se identificó *Candidatus* Arthromitus, bacteria que no ha logrado todavía cultivarse, y que es responsable de gastroenteritis en trucha (Cecchini y col., 2012). *V. harveyi* y *V. parahaemolyticus* pueden permanecer en la capa mucosa del tracto gastrointestinal por adhesión a las proteínas del mucus (Chisada y col., 2013) y, por esta vía, pasar a través de la capa mucosa para finalmente adherirse a las células intestinales. Además, Chisada y col., (2013) también observaron la capacidad de *V. harveyi* para fijarse a las células epiteliales del tracto intestinal de ejemplares de *Pagrus major*. Finn y col., (2014) demostraron que *V. parahaemolyticus* causó una ruptura de la resistencia transepitelial en un co-cultivo de las células M y Caco-2 (M cell-like Caco-2/ Raji B), translocándose un gran número de células bacterianas. En nuestro caso, no podemos afirmar que la vía de entrada de los patógenos detectados haya sido por vía digestiva, necesi-tándose más ensayos para su determinación.

A los 30 días del comienzo de la infección, el grupo PHD presentó un número de células caliciformes totales mayor que el observado en el grupo CHD. La capa mucosa secretada por las células caliciformes que cubre el epitelio actúa como un medio de protección, lubricación y transporte entre el lumen intestinal y las células epiteliales (Smirnow y col., 2005), actuando como la primera barrera de defensa para el paso de microorganismos y sus productos (Kim y Ho, 2010; Sherman y col., 2009). Varios estudios han correlacionado el incremento en el número de células caliciformes con la capacidad de producción de eicosanoides en peces (Holland y col., 1999; Torrecillas y col., 2013), y en particular, las prostaglandinas (PGs), las cuales ejercen un control sobre la inflamación o inmunidad, y cuyos receptores se expresan en gran cantidad en las células caliciformes del intestino (Northey y col., 2000). Autores como Kim y Ho, (2010) y Sherman y col., (2009) obtuvieron datos relacionados con la capacidad de algunos probióticos de inducir cambios en la capa mucosa, alterando cualitativamente las mucinas intestinales e inhibiendo la adherencia de enteropatógenos. Además, también hay estudios que apoyan que la producción de mucinas puede estar regulada a nivel transcripcional por ciertos microorganismos y/o sus productos (Andrianifahanana y col., 2006; Kim y Ho, 2010; Thai y col., 2008).

Torrecillas y col., (2011a) sugirieron que la mejora en el número de células secretoras de mucus en ejemplares de *D. labrax* estaba relacionado con una mejora frente a las infecciones bacterianas. La mayor resistencia a la infección mostrada por los ejemplares del grupo PHD podría estar relacionada con el incremento de los niveles plasmáticos de metabolitos, como glucosa y aminoácidos, en individuos de *S. senegalensis* cultivados, como ya observaron otros autores (Costas y col., 2011b; García de la Banda y col., 2011; Varela y col., 2010). Estos resultados fueron acordes con otros obtenidos en ejemplares de tilapia cultivados bajo condiciones de alta densidad y alimentados con bacterias probióticas, mostrando tanto niveles de glucosa plasmática elevados, como una mayor expresión génica que reflejaba un metabolismo más activo en comparación con los peces alimentados con la dieta comercial. Estos resultados sugieren que una dieta suplementada con probióticos puede incrementar la disponibilidad energética para que el individuo pueda hacer frente al nuevo gasto metabólico en respuesta a estrés y por tanto, mostrar una mejor tolerancia al mismo.

5. Evaluación del efecto de la administración continuada del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Aunque el cultivo larvario de *S. senegalensis* hoy en día no es un factor limitante (Fernández-Díaz y col., 2001), sí lo es el hecho de llevar a los ejemplares hasta la fase de destete (Engrola y col., 2007; 2009). Esta limitación es debida principalmente al bajo grado de diferenciación del estómago que presentan las larvas en esa etapa, y a que el alimento vivo deja de recibirse. Dado que el alimento vivo ejerce un importante efecto sobre la microbiota intestinal (Carnevali y col., 2006; Suzer y col., 2008), es comprensible entender los desórdenes que surgen en la misma cuando comienza la alimentación inerte.

5.1. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 coloniza el intestino y modula la microbiota intestinal de las larvas de *Solea senegalensis*

Las larvas alimentadas con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 mostraron un aumento significativo en su peso corporal frente a las alimentadas con la dieta Control. Del mismo modo, también se ha observado mayor crecimiento en juveniles de *S. senegalensis* que recibieron una dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 (García de la Banda y col., 2010b, 2012; Saénz de Rodrigañez y col., 2009). Este crecimiento superior podría estar relacionado con una mejora de las actividades enzimáticas llevadas a cabo por la microbiota intestinal, como ya propusieron Saénz de Rodrigañez y col., (2009), demostrando niveles superiores de actividad leucina aminopeptidasa en los ejemplares que recibieron el tratamiento con *S. putrefaciens* Pdp11 (Saénz de Rodrigañez y col., 2009). Esta enzima se ha utilizado como un indicador de la maduración de los enterocitos y del estado nutricional del organismo (Cahu y col., 1995). Estos resultados, que coinciden con varios estudios, han asociado el uso de microorganismos probióticos con un mejor crecimiento de los peces, y una estimulación de las actividades totales y específicas de ciertas enzimas digestivas (Buts y col., 1999; Tovar-Ramírez y col., 2010; 2004), mejorando los procesos digestivos y la utilización de los nutrientes (Lin y col., 2004).

Con el objetivo de ver si estas diferencias pudieran estar asociadas a posibles cambios que se hubieran producido en la microbiota intestinal larvaria por efecto del probiótico, se analizaron los patrones de bandas de DGGE de la microbiota, comprobándose que, al igual que lo observado en ejemplares de la fase de engorde, *S. putrefaciens* Pdp11 también moduló la microbiota intestinal de las larvas de *S. senegalensis*. Se observó una mayor similitud en la microbiota intestinal de larvas que recibieron la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, aunque esta similitud no fue tan acusada como en el caso de los especímenes ensayados durante la fase de engorde. De cualquier manera, no se dieron cambios significativos en los parámetros ecológicos analizados en las larvas alimentadas con *Artemia* suplementada con probiótico.

La secuenciación de las bandas obtenidas en el patrón de DGGE mostró, al igual que en otros peces en la fase de destete, la dominancia del grupo γ -Proteobacteria (Brunvold y col., 2007; De Paula Silva y col., 2011).

Los resultados obtenidos también permitieron comprobar que las mayores contribuciones a las diferencias entre los patrones fueron aportadas por *Photobacterium angustum*, *V. natrieigens*, *V. penaeicida* y *V. parahaemolyticus*. La primera de las especies citadas sólo aparecía en los patrones de bandas de la microbiota intestinal de los ejemplares del grupo Control. *V. natrieigens* se ha aislado a partir de la microbiota de organismos acuáticos (Feng y col., 2011) y no se ha descrito como patógena, aunque se dispone de datos recientes que parecen relacionar la presencia de cepas de esta especie con procesos patológicos (Rivera-Posada y col., 2011). Por otra parte, y como ya se ha descrito anteriormente, si bien existen cepas de *V. parahaemolyticus* que no son patógenas, también se han descrito cepas que sí lo son y que causan mortalidades significativas en cultivos larvarios de distintos organismos acuáticos (Aguirre-Guzmán y col., 2001). Por último, *V. penaeicida* es una especie descrita como patógena, especialmente para crustáceos (Goarant y Merien, 2006; Labreuche y col., 2012).

Al final del periodo del destete, cuando la cantidad suministrada del probiótico era mínima, el microorganismo *S. putrefaciens* Pdp11 se detectó en las larvas con alimentación suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11, confirmando la capacidad de colonización del tracto intestinal por parte del probiótico, y que ya ha sido previamente en el estadio de engorde. Esto indica, que el probiótico podría ejercer su efecto beneficioso en el mismo lugar durante un tiempo prolongado (Lee y col., 2004).

5.2. Los cambios inducidos por *Shewanella putrefaciens* Pdp11 en la microbiota intestinal de las larvas de *Solea senegalensis* están relacionados con la proporción DHA/EPA y el crecimiento larvario

Los resultados referidos a los niveles de ácidos grasos tales como los ácidos linoleico, linolénico y ácido docosahexaenoico (DHA, 22:6n-3) no mostraron cambios significativos entre las larvas que recibieron el probiótico y las que no. Esto contrasta con los resultados obtenidos especialmente en la fase de engorde (*Diseño experimental 7.1*), y en los que se pudo ver que la dieta con *S. putrefaciens* Pdp11 produjo incrementos en los niveles de estos mismos ácidos grasos.

La microbiota intestinal puede participar en la modulación de la absorción intestinal, el metabolismo y la exportación de ácidos grasos hacia los tejidos (Semova y col., 2012). Dadas las diferencias observadas en este estudio entre la microbiota intestinal de las larvas y de los juveniles de *S. senegalensis* cabría esperar diferencias en los efectos inducidos como puede ser los niveles de ácidos grasos.

El ACP generó dos ejes que acumularon casi el 70% de la varianza observada. La mayor parte de la microbiota asociada a la alimentación suplementada con el probiótico, junto con las concentraciones de DHA, proteínas y el aumento de peso, se dispusieron en la parte positiva del F1; mientras que, la microbiota asociada a los individuos Control se segregó hacia el extremo negativo del F1, donde se encontraban las mayores concentraciones del ácido eicosapentaenoico (EPA, 20:5n-3). Las especies presentes en las larvas alimentadas con el probiótico estaban relacionadas con *S. putrefaciens* Pdp11, así como con las especies *V. fisheri*, *V. natrieigens* y *V. shilonii*.

Shewanella y *Vibrio* son géneros que incluyen especies capaces de producir EPA y DHA (Gentile y col., 2003; Hirota y col., 2005; Ringø y col., 1992a,b; Russell y Nichols, 1999). Esto parece indicar que la modulación de la microbiota intestinal ejercida por la aplicación del probiótico tiene una relación directa con el componente F1, al igual que los niveles de los ácidos grasos EPA y DHA. En este contexto, Semova y col., (2012) propuso varios mecanismos, no excluyentes, que explican el papel de los microorganismos intestinales en la estimulación de la absorción de los ácidos grasos. Uno de ellos es el incremento de la biodisponibilidad de los mismos modificando la producción, o composición de las sales biliares; o bien contribuyendo a la actividad lipolítica luminal que promueve la disponibilidad de los ácidos grasos. *S. putrefaciens* Pdp11 presenta resistencia a las sales biliares de peces (Chabrellón, 2003) y la capacidad de producir lipasas (García de la Banda y col., 2011). Esta última actividad es también muy frecuente en algunas especies del género *Vibrio* (Beleneva y Maslennikova, 2005; Qiao y col., 2012; Snoussi y col., 2009; Soto-Rodriguez y col., 2012). De cualquier manera, son necesarios más estudios para analizar el impacto que la modulación ejercida por el probiótico sobre la microbiota intestinal tiene sobre la absorción y el metabolismo de los lípidos en el intestino.

6. Determinación del efecto de la administración durante la metamorfosis de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* sobre la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*

Resulta interesante señalar que la etapa larvaria recoge una gran diversidad de acontecimientos como son el inicio de la alimentación exógena, el tránsito de un alimento vivo (rotífero) a otro (*Artemia*), el paso de una natación pelágica a bentónica y una gran cantidad de cambios en relación a la metamorfosis (10-20 dpe). Además la coalimentación con microencapsulado, iniciada a día 10 con la *Artemia*, queda asentada sobre el día 30 cuando se inicia el estadio postlarvario. Estas etapas implican la necesidad de un aporte energético extra (Parra y Yufera, 2001), o un metabolismo capaz de hacer frente a esas necesidades, con la circunstancia añadida de que aún se está desarrollando el sistema inmunitario y existe una mayor susceptibilidad frente a patógenos oportunistas presentes en el medio ambiente. Por todo esto, se consideró interesante averiguar si un pulso corto de *S. putrefaciens* Pdp11 aplicado en esta etapa (10-30 dpe) modularía la microbiota intestinal asociado a beneficios como se ha demostrado con un tiempo más largo.

6.1. Tiempos cortos de aplicación del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 también modulan la microbiota intestinal

El análisis de los patrones de DGGE mostró agrupaciones independientes entre los ejemplares del tratamiento Control y probiótico a 56 y 87 dpe. En el caso de 23 dpe (final del proceso de metamorfosis) las larvas tratadas con probiótico mostraron una similitud intragrupo menor que en el caso del tratamiento Control. Las modificaciones en la microbiota intestinal más acusadas se pudieron observar tanto a 56 como a 87 dpe, por lo que parece que hace falta un tiempo transitorio para el establecimiento de las comunidades microbianas inducidas por el tratamiento probiótico. Este periodo de adaptación, también se ha observado en peces

como la lubina (*D. labrax*) alimentados con dietas suplementadas con poly β -hidroxibutirato (PHB) (De Schryver y col., 2010).

Como ya se ha señalado, el destete es un periodo crítico y si ocurre en circunstancias desfavorables ya sea de índole medioambiental o dietética, los individuos en estadio post larvario pueden ver reducidas, entre otros factores, sus tasas de crecimiento (Engrola y col., 2009; Mai y col., 2009). En nuestro estudio, el destete se llevó a cabo desde 56 a 87 dpe y el crecimiento de individuos alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 fue significativamente superior al presentado por los ejemplares de los grupos Control a en esta etapa (Lobo y col., 2014b).

En el *Diseño experimental 7.5*, se pudo observar que periodos prolongados de administración del probiótico resultan en porcentajes menores de similitud entre los patrones de DGGE de los ejemplares del mismo grupo. Esto parece indicar que aunque *S. putrefaciens* Pdp11 coloniza el intestino de las larvas, los efectos sobre la microbiota intestinal no se prolongan hasta la etapa de alevín. Sin embargo, en los experimentos anteriores en los que se administraba el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 en ejemplares de engorde, durante un periodo de 60 días se ha dado una modulación de la microbiota intestinal de juveniles de *S. senegalensis* (*Diseño experimental 7.1*) y que además, se ha mantenido a lo largo de 30 días más (*Diseño experimental 7.2*).

La técnica DGGE permite la detección de los taxones bacterianos (Woodcock y col., 2007) y los cambios en la diversidad de los mismos. Estos cambios pueden indicar alteraciones ecológicas en las características de las comunidades bacterianas (Van der Gast y col., 2006; Woodcock y col., 2007). En este contexto, la diversidad de la microbiota de las larvas que recibieron *S. putrefaciens* Pdp11 fue inferior a la de las larvas del tratamiento Control a 56 y 87 dpe. Por el contrario, los valores de Rr fueron superiores en aquellas larvas alimentadas con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, y por tanto reflejan una mayor variabilidad genética de la microbiota intestinal (De Schryver y col., 2010). Estas diferencias observadas tanto para los valores de diversidad (H') como de habitabilidad (Rr) indican un cambio en la microbiota atribuible a la modulación realizada por el probiótico, como ha sido también descrito en lenguados juveniles por García de la Banda y col., (2010a) y en el *Diseño experimental 1*. En este sentido, otros microorganismos como *Bacillus licheniformis* (Kumar y col., 2013a), *Pediococcus acidilactici* (Villamil y col., 2010) y *Enterococcus faecium* (Avella y col., 2011), propuestos como probióticos en acuicultura, también han sido capaces de modular la microbiota digestiva de otras especies como crustáceos (*Macrobrachium rosenbergii*) y peces (*S. maximus* y *S. solea*).

También en esta ocasión, la mayoría de los taxones bacterianos detectados se identificaron como pertenecientes a los grupos γ -Proteobacteria y Firmicutes, grupos que están habitualmente también en otros peces (Navarrete y col., 2010) incluyendo *S. senegalensis* (Martin-Antonio y col., 2007).

En la microbiota de los ejemplares del grupo Control se detectó un núcleo de microorganismos que incluyen especies bacterianas pertenecientes a los grupos identificados como *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Allivibrio*, *Rhodococcus*, *Geobacillus*, *Mycoplasma*, así como las especies *Brevibacillus parabrevis* y *P. damsela* subsp *piscicida*, que además se mantuvieron a lo largo del estudio. La mayoría de estos grupos de

microorganismos no se habían descrito previamente como componentes habituales de la microbiota intestinal de juveniles de lenguado.

La microbiota intestinal de los peces se ve muy afectada por el ambiente acuático (Vadstein y col., 2013) y en el caso de las larvas puede darse un incremento de la abundancia y diversidad microbiana después de recibir el primer alimento (Ingerslew y col., 2014). Høj y col., (2009) observaron que los nauplios de *Artemia* son una fuente importante de bacterias que se pueden transferir a las larvas junto con el alimento vivo. En relación con esto, se ha visto que el grupo γ -Proteobacteria es el grupo más abundante en los nauplios de *Artemia* recién eclosionadas, siendo *Halomonas*, *Vibrio* y *Pseudomonas* algunos de los géneros más frecuentes (Høj y col., 2009; Tkavc y col., 2011).

6.2. La administración de *Shewanella putrefaciens* Pdp11 reduce la presencia de *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* en la microbiota de larvas

En el caso de las larvas alimentadas con *Artemia* junto con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11, se detectó un núcleo de especies constituido por *P. acephalatica*, *V. parahaemolyticus*, *L. helveticus* y otras del género *Shewanella*, incluyendo *S. putrefaciens* Pdp11. Este núcleo puede ser el responsable de la modulación microbiana ejercida por el probiótico que se observó desde 23 dpe cuando el porcentaje de clones relacionados con *S. putrefaciens* Pdp11 fue superior. Por otra parte, clones relacionados con los grupos *Mycoplasma*, *Anoxybacillus* y las especies *Allivibrio* sp. *Candidatus* Arthromitus, *P. damsela* subsp. *piscicida* y especies del género *Rhodococcus* no se detectaron en la microbiota intestinal de estos ejemplares, mientras que sí estuvieron presentes en la microbiota intestinal de las larvas Control. Los dos últimos, *Candidatus* Arthromitus y *P. damsela* subsp. *piscicida* se han detectado en la microbiota intestinal de otros peces cultivados (Cecchini y col., 2012; De Paula Silva y col., 2011). Como se ha dicho anteriormente, *Candidatus* Arthromitus ha sido sugerido como el agente etiológico del síndrome gastrointestinal en trucha (Urdaci y col., 2001), mientras *P. damsela* subsp. *piscicida* es un patógeno importante para *S. senegalensis* (Zarza y Padrós, 2008; Zorrilla y col., 1999).

Cabe destacar en este estudio la ausencia o menor presencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* en la microbiota intestinal de las larvas alimentadas con la dieta suplementada con *S. putrefaciens* Pdp11 en paralelo con un incremento de la presencia del probiótico. Las bacterias probióticas vivas pueden presentar un efecto importante sobre las especies ya establecidas debido a mecanismos o actividades antagonistas y /o la competición por espacio y nutrientes, reduciendo el número de bacterias patógenas (Magnadottir, 2010). En este estudio, la ausencia de *P. damsela* subsp. *piscicida* podría estar relacionada con la capacidad mostrada por *S. putrefaciens* Pdp11 de inhibir la adhesión de este patógeno al mucus intestinal de lenguado (Chabrilón y col., 2005a); sin embargo, tampoco pueden descartarse otros mecanismos que podrían explicar la mayor resistencia hacia este patógeno observada en ejemplares juveniles de *S. senegalensis* alimentados con una dieta suplementada con el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 (Díaz-Rosales y col., 2009; García de la Banda y col., 2011; 2012).

Por lo que respecta a *L. helveticus*, se ha descrito como una bacteria con una alta actividad proteolítica (Beganovic y col., 2013) y con diferentes capacidades probióticas, tales como la capacidad inmunomoduladora por secreción de péptidos bioactivos liberados durante la fermentación (Taverniti y col., 2013; Vinderola y col., 2007), la mejora en la proporción de células caliciformes/colonocitos, la mejor recuperación de la atrofia mucosa inducida por malnutrición (Dock-Nascimento y col., 2007), así como el efecto antibacteriano por acción de sus proteínas de membrana o bien, por presentar mecanismos de exclusión competitiva (Ahire y col., 2013; Beganovic y col., 2011).

El género *Shewanella* ha sido establecido como el taxón predominante en ejemplares de *S. senegalensis* alimentados con comida natural (Martín-Antonio y col., 2007) pero también nuestros experimentos demuestran que la alimentación puede ser con dieta comercial (*Diseño experimental 7.1 y 7.2*). En cuanto al género *Shewanella*, se ha descrito como componente predominante habitual en la microbiota intestinal de otras especies de peces como *O. mykiss* (Navarrete y col., 2010), *C. auratus* (De Paula Silva y col., 2011) o *H. hipoglossus* (Bjornsdottir y col., 2009). *S. putrefaciens* Pdp11 se detectó en la microbiota de los ejemplares alimentados con el probiótico desde 23 al 119 dpe. La administración de *S. putrefaciens* Pdp11 también dio lugar a un incremento en el número de clones del género *Vibrio*, especialmente los identificados como *V. parahaemolyticus*. Las especies de *Vibrio* se aíslan frecuentemente tanto del agua del mar como de la superficie de peces sanos mantenidos en sistemas acuícolas (Chakraborty y Surendran, 2009; Montes y col., 2006); pero siempre hay que tener en presente como ya se ha dicho en otros apartados de este estudio, que también incluye cepas virulentas que pueden producir enfermedades importantes en organismos acuícolas (Khuntia y col., 2008; Macpherson y col., 2012) incluido *S. senegalensis* (Zorrilla y col., 2003). No obstante, la presencia de especies del género *Vibrio* en la microbiota intestinal de larvas de *S. senegalensis* no se debe considerar siempre como factor de riesgo ya que en nuestro caso, las tasas de supervivencia de los ejemplares Control y los alimentados con *S. putrefaciens* Pdp11 a 119 dpe presentaron valores entre 88,05-89,83% (Lobo y col., 2014, comunicación personal).

7

CONCLUSIONES

*“Nuestro conocimiento es necesariamente finito,
mientras que nuestra ignorancia es necesariamente infinita”*

K. Raimund Popper

7. CONCLUSIONES

1. La administración del probiótico *Shewanella putrefaciens* Pdp11 modula la microbiota intestinal de *Solea senegalensis*. Además, el probiótico es capaz de colonizar el tracto intestinal de esta especie piscícola durante las fases larvarias y de engorde, siendo esta colonización más prolongada si las células del probiótico se administran sin liofilizar.

2. La modulación de la microbiota intestinal de *S. senegalensis* ejercida por el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 está relacionada con menores niveles de inclusiones lipídicas en el interior de hepatocitos y enterocitos.

3. La administración conjunta del antibiótico oxitetraciclina y del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 atenúa la reducción de la diversidad de la microbiota intestinal de *Solea senegalensis* causada por el antibiótico.

4. Los cambios producidos por el probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 en la microbiota intestinal de ejemplares de *S. senegalensis* tratados con el antibiótico oxitetraciclina están asociados a incrementos en la transcripción de genes que codifican proteínas con carácter antiapoptótico.

5. Los cambios inducidos en la microbiota intestinal por la administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 a ejemplares de *S. senegalensis* cultivados en condiciones de sobrepoblación se relacionan con los cambios en la histología del intestino de estos especímenes, así como con una mejor respuesta frente a la enfermedad por parte de estos.

6. La administración de *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulado en *Artemia* durante el periodo larvario y postlarvario se relaciona con un mayor contenido proteico y crecimiento de los ejemplares de *S. senegalensis*, así como con los cambios en su microbiota intestinal.

7. La administración del probiótico *S. putrefaciens* Pdp11 a larvas de *S. senegalensis* entre 10 y 30 días después de la eclosión de los huevos induce cambios en la composición de la microbiota intestinal, limitando la presencia de *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*.

8

BIBLIOGRAFÍA

“La información de hoy es el arma del mañana”

Anónimo

8. BIBLIOGRAFÍA

Abellán E y Basurco B (1999). Marine Finfish Species Diversification: Current Situation and Prospects in Mediterranean Aquaculture. *Cahiers Options Méditerranéennes Serie B:Etudes et Recherches*, 24:1016-1228.

Abelli L, Randelli E, Carnevali O, Picchiatti S (2009). Stimulation of gut immune system by early administration of probiotic strains in *Dicentrarchus labrax* and *Sparus aurata*. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1163:340-342.

Abu-Elala N, Marzouk M, Moustafa M (2013). Use of different *Saccharomyces cerevisiae* biotic forms as immune-modulator and growth promoter for *Oreochromis niloticus* challenged with some fish pathogens. *International Journal of Veterinary Science and Medicine*, 1:21-29.

Adams A, Burnell G, Allan G (2009). Advances in disease diagnosis, vaccine development and other emerging methods to control pathogens in aquaculture. *New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environmental management*, 197-214.

Aguilera E, Yany G, Romero J (2013a). Microbiota intestinal cultivable de juveniles de dorada (*Seriola lalandi*) en un sistema de acuicultura. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41:395-403.

Aguilera E, Yany G, Romero J (2013b). Cultivable intestinal microbiota of yellowtail juveniles (*Seriola lalandi*) in an aquaculture system. *Latin American Journal of Aquatic Research*, 41:395-403.

Aguirre-Guzmán G, Vázquez-Juares R, Ascencio F (2001) Differences in the susceptibility of American white shrimp larval substages (*Litopenaeus vannamei*) to four *Vibrio* species. *Journal of Invertebrate Pathology*, 78:215-219.

Ahire JJ, Mokashe NU, Patil HJ, Chaudhari BL (2013). Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *Journal of Food Science and Technology*, 50:26–34.

Alarcón FJ, Sáenz de Rodrigáñez M, Oña CD, Díaz M, Moyano FJ, Martínez MI (2005). Growth and digestive enzymes of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae weaned onto different commercial diets. *Boletín-Instituto Español de Oceanografía (España)*.

Al-Harbi AH y Uddin MN (2004). Seasonal variation in the intestinal bacterial flora of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* x *O. aureus*) cultured in earthen ponds in Saudi Arabia. *Aquaculture*, 229:37–44.

Al-Hisnawi A, Ringø E, Davies SJ, Waines P, Bradley G, Merrifield DL (2014). First report on the autochthonous gut microbiota of brown trout (*Salmo trutta* Linnaeus). Aquaculture Research, DOI:10.1111/are.12451.

Allsopp M, Flores-Aguilar R, Watts E (2011). Abalone culture. Recent advances and new species in aquaculture, B. Wiley-Blackwell, 416:231-251.

Almeida J, Galhenage S, Yu J, Kurtovic J, Riordan SM (2006). Gut flora and bacterial translocation in chronic liver disease. World Journal of Gastroenterology, 12:1493-1502.

Alonso MC, Cano I, García-Rosado E, Castro D, Lamas J, Barja JL, Borrego JJ (2005). Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). Journal of Fish Diseases, 28:221-228.

Altinok I, Kayis S, Capkin E (2006). *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. Aquaculture, 26:850-855.

Aly SM, Ahmed YAG, Ghareeb AAA, Mohamed MF (2008). Studies on *Bacillus subtilis* and *Lactobacillus acidophilus*, as potential probiotics, on the immune response and resistance of Tilapia nilotica (*Oreochromis niloticus*) to challenge infections. Fish and Shellfish Immunology, 25:128-136.

Amann RI, Ludwig W, Schleifer KH (1995). Phylogenetic identification and *in situ* detection of individual microbial cells without cultivation. Microbiological Reviews, 59:143-169.

Anbu P, Annadurai G, Lee JF, Hur BK (2009). Optimization of alkaline protease production from *Shewanella oneidensis* MR-1 by response surface methodology. Journal of Chemical Technology and Biotechnology, 84:54-62.

Andersen CL, Jensen JL, Ørntoft TF (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. Cancer Research, 64:5245-5250.

Anderson A (2013). The effect of the probiotic *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota ecology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) analysed using DGGE. The Plymouth Student Scientist, 6:86-103.

Andreoni V, Cavalca L, Rao MA, Nocerino G, Bernasconi S, Dell'Amico E, Colombo M, Gianfreda L (2004). Bacterial communities and enzyme activities of PAHs polluted soils. Chemosphere, 57:401-412.

Andrianifahanana M, Moniaux N, Baha SK (2006). Regulation of mucin expressions mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. Biochimica et Biophysica Acta, 1765:189-222.

APROMAR, 2015: La acuicultura en España. 2015.

Arig N, Suzer C, Gokvardar A, Basaran F, Coban D, Yildirim S, Saka S (2013). Effects of probiotic (*Bacillus* sp.) supplementation during larval development of Gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.). Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 13:407-414.

Aragao C, Conceicao LEC, Dias J, Marques AC, Gomes E, Dinis MT (2003a). Soy protein concentrate as a protein source for Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) diets: effects on growth and amino acid metabolism of postlarvae. Aquaculture Research, 34:1443-1452.

Aranguren R, Tafalla C, Novoa B, Figueras A (2002). Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus and seabream, *Sparus aurata*, using different infection models. Journal of Fish Diseases, 25:317-24.

Arboleda MD y Reichardt WT (2010). *Vibrio* sp. causing Porites ulcerative white spot disease. Diseases of Aquatic Organisms, 90:93-104.

Arijo S, Chabrillón M, Díaz-Rosales P, Rico R, Martínez-Manzanares E, Balebona, Toranzo AE, Moriñigo MA (2005a) Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Bulletin- European Association of Fish Pathologists, 25:148–154.

Arijo S, Rico R, Chabrillón M, Díaz-Rosales, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Magariños B, Toranzo AE, Moriñigo MA (2005b). Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Journal of Fish Diseases, 28:33–38.

Arjona FJ, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Martín del Río MP, Flik G, Mancera JM, Klaren PHM (2010). Acclimation of *Solea senegalensis* to different ambient temperatures: implications for thyroidal status and osmoregulation. Marine Biology, 157:1325–1335.

Ashare A, Nymon AB, Doerschug KC, Morrison JM, Monick MM, Hunninghake GW (2008). Insulin-like growth factor-1 improves survival *in sepsis* via enhanced hepatic bacterial clearance. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 178:149-157.

Askarian F, Kousha A, Salma W, Ringø E (2011). The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. Aquaculture Nutrition, 17:488–497.

Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E (2012). Culturable autochthonous gut bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and *in vitro* growth inhibition of four fish pathogens. Aquaculture, 326:1-8.

Austin B, Austin D, Sutherland R, Thompson F, Swings J (2005). Pathogenicity of vibrios to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) and *Artemia* nauplii. Environmental Microbiology, 7:1488-1495.

Austin B (2006). The bacterial microflora of fish, revised. The Scientific World Journal, 6:931-945.

Austin B y Zhang XH (2006). *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Letters of Applied Microbiology*, 43:119-24.

Austin B (2010). Vibriosis as causal agents of zoonoses. *Veterinary Microbiology*, 140:310.

Avella MA, Gioacchini G, Decamp O, Makridis P, Bracciatelli C, Carnevali O (2010). Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture*, 305:12-19.

Avella MA, Olivotto I, Silvi S, Ribecco C, Cresci A, Palermo F, Polzonetti A, Carnevali O (2011). Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture*, 315:384-393.

Avendaño-Herrera R, Magariños B, Morinigo MA, Romalde JL, Toranzo AE (2005). A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin of the European Association of Fish Pathologists*, 25:70-74.

Azad P, Ryu Haddad GG (2011). Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia. *Free Radical Biology and Medicine*, 51:530-538.

Azeredo R, Afonso A, Oliva-Teles A, Costas B (2013). Arginine or glutamine supplementation to culture media modulates innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) head-kidney leukocytes. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1695-1695.

Badillo-Zapata D, Correa-Reyes G, D'Abramo L, Lazo J, Toro-Vázquez J, Viana M (2010). Effect of replacing dietary fish oil with vegetable oils on the fatty acid composition of muscle tissue of juvenile California halibut (*Paralichthys californicus*). *Ciencia Marina*, 36:121-133.

Bagheri T, Hedayati S A, Yavari V, Alizade M, Farzanfar A (2008). Growth, survival and gut microbial load of rainbow trout (*Onchorhynchus mykiss*) fry given diet supplemented with probiotic during the two months of first feeding. *Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 8:43-48.

Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Lyte M (2011). Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain, Behavior and Immunity*, 25:397-407.

Bairagi A, Ghosh KS, Sen SK, Ray AK (2002). Enzyme producing bacterial flora isolated from fish digestive tracts. *Aquaculture International*, 10:109-121.

Balcázar JL, de Blas I, Ruíz-Zarzuela I, Cunningham D, Vendrell D, Múzquiz JL (2006). The role of probiotics in aquaculture. *Veterinary Microbiology*, 114:173-186.

Balcázar JL, De Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Vendrell D, Calvo AC, Márquez I, Girones O, Muzquiz JL (2007). Changes in intestinal microbiota and humoral immune response following probiotic administration in brown trout (*Salmo trutta*). *British Journal of Nutrition*, 97:522-527.

Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Muzquiz JL, Girones O (2008). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish. *Aquaculture*, 278:188-191.

Balcázar JL, Vendrell D, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I, Múzquiz JL (2009). Effect of *Lactococcus lactis* CLFP 100 and *Leuconostoc mesenteroides* CLFP 196 on *Aeromonas salmonicida* infection in brown trout (*Salmo trutta*). *Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology*, 17:153-157.

Balebona MC, Andreu MJ, Bordas MA, Zorrilla I, Moriñigo MA, Borrego JJ (1998). Pathogenicity of *Vibrio alginolyticus* for cultured gilt head sea bream (*Sparus aurata* L.). *Applied of Environment Microbiology*, 64:4269-4275.

Bandyopadhyay P y Mohapatra PKD (2009). Effect of a probiotic bacterium *Bacillus circulans* PB7 in the formulated diets: on growth, nutritional quality and immunity of *Catla catla* (Ham.). *Fish Physiology and Biochemistry*, 35:467-478.

Barata C, Varo I, Navarro JC, Arun S, Porte C (2005). Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part C: Toxicology Pharmacology*, 140:175-16.

Barton BA y Iwama GK (1991). Physiological changes in fish from stress in aquaculture with emphasis on the response and effects of corticosteroids. *Annual Review of Fish Diseases*, 1:3-26.

Barton BA (2002). Stress in fishes: A diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. *Integrative and Comparative Biology*, 42:517-525.

Baskaralingam V y Rajagopalan T (2014). Medicinal plant derivatives as immunostimulants: an alternative to chemotherapeutics and antibiotics in aquaculture. *Aquaculture International*, 22:1079-1091.

Batista S, Tapia-Paniagua ST, Moriñigo MA, Nuñez- Díaz JA, Gonçalves JFM, Barros R, Cristóvão B, Valente LMP, Ozório ROA (2013). Expression of immune response genes in sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) induced by dietary probiotic supplementation following exposure to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1638-1639.

Beaumont C (2004). Molecular mechanisms of iron homeostasis. *Medical Science*, 20:68-72.

Beganović J, Frece J, Kos B, Pavunc AL, Habjanič K, Šušković J (2011). Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Antoine Van Leeuwenhoek Journal*, 100:43-53.

Beganovic J, Kos B, Pavunc AL, Uroic K, Dzidara P, Suskovic J (2013). Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobic*, 20:58-64.

Beirão J, Soares F, Pousão-Ferreira P, Diogo P, Dias J, Dinis MT, Herráez MP, Cabrita E (2015). The effect of enriched diets on *Solea senegalensis* sperm quality. *Aquaculture*, 435:187-194.

Beleneva IA y Maslennikova EF (2005). Hydrolytic activity of marine bacteria associated with the mussel *Mytilus trossulus*. *Mikrobiolochnyi Zhurnal*, 67:3-8.

Bell JG, McGhee F, Dick JR, Tocher DR (2005). Dioxin and dioxin-like polychlorinated biphenyls (PCBs) in Scottish farmed salmon (*Salmo salar*): effects of replacement of dietary marine fish oil with vegetable oils. *Aquaculture*, 243:305-314.

Bellwood DR, Hughes TP, Hoey AS (2006). Sleeping functional group drives coral-reef recovery. *Current Biology*, 16:2434-2439.

Ben-Mkaddem S, Pedruzzi E, Werts C, Coant N, Bens M, Cluzeaud F, Goujon JM, Ogier-Denis E, Vandewalle A (2010). Heat shock protein gp96 and NAD(P)H oxidase 4 play key roles in Toll-like receptor 4-activated apoptosis during renal ischemia/reperfusion injury. *Cell Death and Differentiation*, 17:1474-1485.

Benedito-Palos L, Saera-Vila A, Caldach-Giner JA, Kaushik S, Pérez-Sánchez J (2007). Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): Networking of systemic and local components of GH/IGF axis. *Aquaculture*, 267:199-212.

Benhamed S, Guardiola FA, Mars M, Esteban MA (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*, DOI:10.1016/j.vetmic.2014.03.008.

Benítez-Dorta V, Caballero MJ, Izquierdo M, Manchado M, Infante C, Zamorano MJ, Montero D (2013). Total substitution of fish oil by vegetable oils in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) diets: effects on fish performance, biochemical composition, and expression of some glucocorticoid receptor-related genes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 39:335-349.

Bethke J, Rojas V, Berendsen J, Cárdenas C, Guzmán F, Gallardo JA, Mercado L (2012). Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids. *Journal of Fish Diseases*, 35:379-388.

Bjornsdottir R, Johannsdottir J, Coe J, Smaradottir H, Agustsson T, Sigurgisladottir G (2009). Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture*, 286:53-63.

Bo J, Cai L, Xu JH, Wang KJ, Au DWT (2011). The marine medaka *Oryzias melastigm*. A potential marine fish model for innate immune study. *Marine Pollution Bulletin*, 63:267-276.

Boglino A, Ortiz-Delgado JB, Darias MJ, Özcan F, Estévez A, Gisbert E (2011). Commercial products for *Artemia* nauplii enrichment are not equivalent for lipid accumulation, growth and development in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. V Workshop The cultivation of the Soles.

Boglino A, Darias MJ, Ortiz-Delgado JB, Özcan F, Estévez A, Andree KB, Hontoria F, Sarasquete C, Gisbert E (2012). Commercial products for *Artemia* enrichment affect growth performance, digestive system maturation, ossification and incidence of skeletal deformities in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 324:290-302.

Boglino A, Wishkerman A, Darias MJ, Andree KB, de la Iglesia P, Estévez A, Gisbert E (2013). High dietary arachidonic acid levels affect the process of eye migration and head shape in pseudoalbino Senegalese sole *Solea senegalensis* early juveniles. *Journal of Fish Biology*, 83:1302-1320.

Boglino A, Darias MJ, Estévez A, Andree KB, Sarasquete C, Ortiz-Delgado JB, Gisbert E (2014a). The effect of dietary oxidized lipid levels on growth performance, antioxidant enzyme activities, intestinal lipid deposition and skeletogenesis in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Nutrition*, 20:692-711.

Boglino A, Darias MJ, Andree KB, Estevez A, Gisbert E (2014b). The effects of dietary arachidonic acid on bone in flatfish larvae: the last but not the least of the essential fatty acids. *Journal of Applied Ichthyology*, 30:643-651.

Bolnick DI, Snowberg LK, Hirsch PE, Lauber CL, Knight R, Caporaso JG, Svanbäck R (2014). Individuals' diet diversity influences gut microbial diversity in two freshwater fish (threespine stickleback and Eurasian perch). *Ecology Letters*, 17:979-987.

Bonacic K, Campoverde C, Sastre M, Hachero-Cruzado I, Ponce M, Manchado M, Morais S (2016). Mechanisms of lipid metabolism and transport underlying superior performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) larvae fed diets containing n-3 polyunsaturated fatty acids. *Aquaculture*, 450:383-396.

Borges P, Oliveira B, Casal S, Dias J, Conceição L, Valente LM (2009). Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilisation of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *British Journal of Nutrition*, 102:1007-14.

Borges P, Medale F, Dias J, Valente LM (2012). Protein utilisation and intermediary metabolism of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) as a function of protein:lipid ratio. *British Journal of Nutrition*, 109:1373-81.

Borges P, Medale F, Veron V, dos Anjos Pires M, Dias J, Valente LM (2013). Lipid digestion, absorption and uptake in *Solea senegalensis*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 166:26-35.

Borges P, Valente LMP, Verón V, Dias K, Panserat S, Médale F (2014). High dietary lipid level is associated with persistent hyperglycaemia and downregulation of muscle Akt-mTOR pathway in Senegalese Sole (*Solea senegalensis*). DOI:10.1371/journal.pone.0102196.

Bowden TJ (2003). A study of the susceptibility of Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* (L.), to viral haemorrhagic septicaemia virus isolated from turbot, *Scophthalmus maximus* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 26:207-212.

Bowden T, Bricknell I, Ellis AE (2003). Fish Vaccination, an overview. *Industry Report: IntraFish*, 5-20.

Braithwaite VA y Ebbesson LOE (2014). Pain and stress responses in farmed fish. *Revue scientifique et technique. International Office of Epizootics*, 33:245-253.

Brunvold L, Sandaa RA, Mikkelsen H, Welde E, Bleie H, Bergh Ø (2007). Characterisation of bacterial communities associated with early stages on intensively reared cod (*Gadus morhua*) using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Aquaculture*, 272:319-327.

Burr G, Hume M, Ricke S, Nisbet D, Gatlin D (2010). *In vitro* and *in vivo* evaluation of the prebiotics GroBiotic®-A, inulin, mannanoligosaccharide, and galactooligosaccharide on the digestive microbiota and performance of hybrid striped bass (*Morone chrysops* × *Morone saxatilis*). *Microbial Ecology*, 59:187-198.

Buts J, De Keyser N, Marandi S (1999). *Saccharomyces boulardii* upgrades cellular adaptation after proximal enterectomy in rats. *Gut*, 45:89-96.

Caballero MJ, López-Calero G, Socorro J, Roo FJ, Izquierdo MS, Fernández AJ (1999). Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 179:277-290.

Cabello FC (2006). Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment. *Environmental Microbiology*, 8:1137-1144.

Cabello FC, Godfrey HP, Tomova A, Ivanova L, Dölz H, Millanao A, Buschmann AH (2013). Antimicrobial use in aquaculture re-examined: its relevance to antimicrobial resistance and to animal and human health. *Environmental Microbiology*, 15:1917-1942.

Cabral HN (2000). Comparative feeding ecology of sympatric *Solea solea* and *S. senegalensis*, within the nursery areas of the Tagus estuary, Portugal. *Journal of Fish Biology*, 57:1550-1562.

Cabral EM, Bacelar M, Batista S, Castro-Cunha M, Ozório ROA, Valente LMP (2011). Replacement of fishmeal by increasing levels of plant protein blends in diets for Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 322-323:74-81.

Cahill M (1990). Bacterial flora of fishes: A review. *Microbial Ecology*, 19:21-41.

Cahu C y Zambonino-Infante JL (1995). Effect of the molecular form of dietary nitrogen supply in sea bass larvae: Response of pancreatic enzymes and intestinal peptidases. *Fish Physiology Biochemistry*, 14:209-214.

Cai J, Han H, Song Z, Li C, Zhou J (2006). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio alginolyticus* from diseased postlarval abalone, *Haliotis diversicolor* supertexta (Lischke). *Aquaculture Research*, 37:1222-1226.

Caipang CMA, Brichmann MF, Kiron V (2009). Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua*, upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 153:261-257.

Calder PC y Kew S (2002). The immune system: a target for functional foods? *British Journal of Nutrition*, 88:S165-S176.

Cano-Gómez A, Bourne DG, Hall MR, Owens L, Hoj L (2009) Molecular identification, typing and tracking of *Vibrio harveyi* in aquaculture systems: current methods and future prospects. *Aquaculture*, 287:1–10.

Cano I, Valverde J, Lopez-Jimena B, Alonso MC, Garcia-Rosado E, Sarasquete C, Borrego JJ, Castro D (2010). A new genotype of Lymphocystivirus isolated from cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., and Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 33:695-700.

Cantas L, Fraser TW, Fjelldal PG, Mayer I, Sørum H (2011). The culturable intestinal microbiota of triploid and diploid juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar*): comparison of composition and drug resistance. *BMC Veterinary Research*, 7:71.

Cañavate JP y Fernández-Díaz C (1999). Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture*, 174:255-263.

Cepeda C y Santos Y (2002). First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 22:388-392.

Capkin E y Altinok I (2009). Effects of dietary probiotic supplementations on prevention/treatment of yersiniosis disease. *Journal of Applied Microbiology*, 106:1147-1153.

Carda-Diéguez M, Mira A, Fouz B (2014). Pyrosequencing survey of intestinal microbiota diversity in cultured sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed functional diets. *FEMS Microbiology Ecology*, 87:451-459.

Carnevali O, de Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S, Cresci A (2006). Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture*, 258:430-438.

Castro C, Pérez-Jiménez A, Guerreiro I, Peres H, Castro-Cunha M, Oliva-Teles A (2012a). Effects of temperature and dietary protein level on hepatic oxidative status of Senegalese sole juveniles (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 163:372-378.

Castro N, Toranzo AE, Devesa S, González A, Nuñez S, Magariños B (2012b). First description of *Edwardsiella tarda* in Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 35:79-82.

Cecchini F, Iacumin L, Fontanot M, Comi G, Manzano M (2012). Identification of the unculturable bacteria *Candidatus* Arthromitus in the intestinal content of trouts using Dot blot and Southern blot techniques. *Veterinary Microbiology*, 156:389-94.

Cerda J, Bobe J, Babin PJ, Admon A, Lubzens E (2008). Functional genomics and proteomic approaches for the study of gamete formation and viability in farmed finfish. *Reviews in Fisheries Science*, 16:56-72.

Cerda J y Manchado M (2013). Advances in genomics for flatfish aquaculture. *Genes and Nutrition*, 8:5-17.

Cerezuela R, Guardiola FA, González P, Meseguer J, Esteban MA (2012). Effects of dietary *Bacillus subtilis*, *Tetraselmis chuii*, and *Phaeodactylum tricornutum*, singularly or in combination, on the immune response and disease resistance of sea bream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 33:342-349.

Cerezuela R, Fumanal M, Tapia-Paniagua ST, Meseguer J, Moriñigo MA, Esteban MA (2013a). Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1063-1070.

Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MÁ (2013b). Effects of dietary inulin, *Bacillus subtilis* and microalgae on intestinal gene expression in gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 34:843-848.

Cesaro C, Tiso A, Del Prete A, Cariello R, Tuccillo C, Cotticelli G, del Vecchio-Blanco C, Loguercio C (2011). Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases. *Digestive and Liver Disease*, 43:431-438.

Cha JH, Rahimnejad S, Yang SY, Kim KW, Lee KJ (2013a). Evaluations of *Bacillus* spp. as dietary additives on growth performance, innate immunity and disease resistance of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) against *Streptococcus iniae* and as water additives. *Aquaculture*, 402:50-57.

Chabrállón M. (2003). Estudio de la interacción de patógenos piscícolas y potenciales bacterias probióticas con las superficies mucosas de dorada (*Sparus aurata*, L.). Tesis doctoral. Universidad de Málaga, Málaga. España.

Chabrállón M, Rico S, Balebona MC, Moriñigo MA (2005a). Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Journal of Fish Diseases*, 28:229-237.

Chabrállón M, Rico RM, Arijo S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriñigo MA (2005b). Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Journal of Fish Diseases*, 28:531-537.

Chabrállón M, Arijo S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriñigo MA (2006). Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquaculture Research*, 37:78-86.

Chakraborty RD y Surendran PK (2009). Incidence and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* from tiger shrimp culture environments along the southwest coast of India. *Food Biotechnology*, 23:284-311.

Chandra R y Rajan MR (2009). Probiotic effect of intestinal bacteria of Koi carp *Cyprinus carpio* var. koi. *Journal of Pure and Applied Microbiology*, 3:363-366.

Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MC (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142:185-189.

Chen S, Ricca LG, Martins MF, Garcia M, Ananias RZ, Mussalem JS, Squaiella C, Longo-Maugeri I, Abel LCJ (2009). Adjuvant effect of LPS and *Propionibacterium acnes* on experimental gastrointestinal nematode infestation in sheep. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 128:290.

Chen T, Wang M, Jiang S, Xiong S, Wei H (2013). The application of polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) method in microbial screening. *African Journal of Biotechnology*, 10:9387-9395.

Cheng JM, Kalliomaki HG, Heilig H, Palva A, Lahteenoja H, de Vos WM, Salojarvi J, Satokari R (2013). Duodenal microbiota composition and mucosal homeostasis in pediatric celiac disease. *BMC Gastroenterology*, 1:113.

Chisada S, Shimizu K, Kamada H, Matsunaga N, Okino N, Ito M (2013). Vibrios adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site. *FEMS Microbiology Letters*, 341:18-26.

Chiu CH, Cheng CH, Gua WR, Guu YK, Cheng W (2010). Dietary administration of the probiotic *Saccharomyces cerevisiae* P13, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper, *Epinephelus coioides*. *Fish and Shellfish Immunology*, 29:1053-1059.

Chiu KH, Liu WS (2014). Dietary administration of the extract of *Rhodobacter sphaeroides* WL-APD911 enhances the growth performance and innate immune responses of seawater red tilapia (*Oreochromis mossambicus* × *Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 418:32-38.

Clarke KR y Ainsworth M (1993). A method of linking multivariate community structure to environmental variables. *Marine Ecology-Progress Series*, 92:205-205.

Conte FS (2004). Stress and the welfare of cultured fish. *Applied Animal Behaviour Science*, 86:205-223.

Cordeiro OD, Silva TS, Alves RN, Costas B, Wuolff T, Richard N, Vareilles M, Conceicao L, Rodrigues P (2012). Changes in liver proteome expression of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) in response to repeated handling stress. *Marine Biotechnology*, 14:714-729.

Cordero H, Guardiola FA, Meseguer J, Cuesta A, Esteban MA (2013). Effect of probiotic *Shewanella putrefaciens* on skin gene expression of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1701.

Cordero H, Esteban MA, Cuesta A (2014). Use of Probiotic Bacteria against Bacterial and Viral Infections in Shellfish and Fish Aquaculture. <http://dx.doi.org/10.5772/57198>

Cordero H, Guardiola FA, Tapia-Paniagua ST, Cuesta A, Meseguer J, Balebona MC, Esteban MÁ (2015). Modulation of immunity and gut microbiota after dietary adminis-

tration of alginate encapsulated *Shewanella putrefaciens* Pdp11 to gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). Fish and Shellfish Immunology. DOI:10.1016/j.fsi.2015.05.010.

Costas A, Aragao C, Mancera JM, Dinis MT, Conceicao L (2008). High stocking density induces crowding stress and affects amino acid metabolism in Senegalese sole *Solea senegalensis* (Kaup 1858) juveniles. Aquaculture Research, 39:1-9.

Costas B, Silva JMG, Conceicao LEC, Dias J, Valente LMP, Afonso A (2010). Influence of fish meal replacement by plant-protein sources and indispensable amino acids supplementation on innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. In European Aquaculture Society Meeting, Porto (Portugal).

Costas B, Conceição LEC, Dias J, Novoa B, Figueras A, Afonso A (2011a). Dietary arginine and repeated handling increase disease resistance and modulate innate immune mechanisms of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Fish and Shellfish Immunology, 31; 838-847.

Costas B, Conceição LEC, Aragão C, Martos JA, Ruiz-Jarabo I, Mancera JM, Afonso A (2011b). Physiological responses of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) after stress challenge: effects on non-specific immune parameters, plasma free amino acids and energy metabolism. Aquaculture, 316:68-76.

Costas B, Aragao C, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Arjona FJ, Dinis MT, Mancera JM, Conceicao L (2011c). Feed deprivation in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles: effects on blood plasma metabolites and free amino acid levels. Fish Physiology and Biochemistry, 37:495-504.

Costas B, Aragão C, Soengas JL, Míguez JM, Rema P, Dias J, Afonso A, Conceição LEC (2012). Effects of dietary amino acids and repeated handling on stress response and brain monoaminergic neurotransmitters in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles. Comparative Biochemistry and Physiology A – Molecular and Integrative Physiology, 161:18-26.

Costas B, Aragão C, Dias J, Afonso A, Conceição LEC (2013a). Interactive effects of a high quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole, *Solea senegalensis*. Fish Physiology and Biochemistry, 39:1141-1151.

Costas B, Rêgo PC, Simões I, Marques JF, Castro-Cunha M, Afonso A. (2013b). Cellular and humoral immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), following challenge with two *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* strains from different geographical origins. Journal of Fish Diseases, 36:543-53.

Costas B, Simões I, Castro-Cunha M, Afonso A (2014). Non-specific immune responses of Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), head-kidney leucocytes against *Tenacibaculum maritimum*. Journal of Fish Diseases, 37:765-769.

Cozzi A, Levi S, Corsi B, Santambrogio P, Campanella A, Gerardi G, Arosio P (2003). Role of iron and ferritin in TNFK-induced apoptosis in HeLa cells. FEBS Letters, 537:187-192.

D'Alvise PW, Lillebø S, Wergeland HI, Gram L, Bergh Ø (2013). Protection of cod larvae from vibriosis by *Phaeobacter* spp.: A comparison of strains and introduction times. *Aquaculture*, 384:82-86.

Dagá P, Feijoo G, Moreira MT, Costas D, Villanueva AG, Lema JM (2013). Bioencapsulated probiotics increased survival, growth and improved gut flora of turbot (*Psetta maxima*) larvae. *Aquaculture International*, 21:337-345.

Dague E, Jorand F, Thomas F, Gaboriaud F (2006). Probing surface structures of *Shewanella* spp by microelectrophoresis. *Biophysical Journal*, 90:2612-2621.

Damaso-Rodrigues ML, Pousao-Ferreira P, Ribeiro L, Coutinho J, Bandarra NM, Gavaia PJ, Narciso L, Morais S (2010). Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: effect on the performance of juvenile *S. senegalensis*. *Aquaculture International*, 18:741-757.

Darias MJ, Boglino A, Manchado M, Ortiz-Delgado JB, Estévez A, Andree KB, Gisbert E (2012). Molecular regulation of both dietary vitamin A and fatty acid absorption and metabolism associated with larval morphogenesis of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology*, 161:130-139.

Das A, Nakhro K, Chowdhury S, Kamilya D (2013). Effects of potential probiotic *Bacillus amyloliquefaciens* FPTB16 on systemic and cutaneous mucosal immune responses and disease resistance of catla (*Catla catla*). *Fish and Shellfish Immunology*, 35:1547-1553.

Day OJ, Howell BR, Akness A, Nygard E (1999). Recent advances in the weaning of sole, *Solea solea* (L.). *European Aquaculture Society Special Publication*, 27:40-41.

De Champs C, Maroncle N, Balestrino D, Rich C, Forestier C (2003) Persistence of Colonization of intestinal mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus* Lcr35, after oral consumption. *Journal of Clinical Microbiology*, 41:1270-12.

DeCollibus DP, Marin A, Andrianov AK (2010). Effect of environmental factors on hydrolytic degradation of water-soluble polyphosphazene polyelectrolyte in aqueous solutions. *Biomacromolecules*, 11:2033-2038.

De Domenico I, Zhang TY, Koenig C, Branch RW, London N, Lo E, Daynes RA, Kushner J, Li D, Ward D, Kaplan J, (2010). Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine induced inflammatory responses in mice. *Journal of Clinical Investigation*, 120:2395-405.

Defoirdt T, Sorgeloos P, Bossier P (2011). Alternatives to antibiotics for the control of bacterial disease in aquaculture. *Current Opinion Microbiology*, 14:251-8.

Delcroix J, Gatesoupe FJ, Desbruyères E, Huelvan C, Le Delliou H, Le Gall, Quazuguel P, Mazurais D, Zamborino-Infante JL (2015). The effects of dietary marine protein hydrolysates on the development of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and associated microbiota. *Aquaculture Nutrition*, 21:98-104.

Del'Duca A, Evangelista Cesar D, Galuppo Diniz C, Abreu PC (2013). Evaluation of the presence and efficiency of potential probiotic bacteria in the gut of tilapia (*Oreochromis niloticus*) using the fluorescent *in situ* hybridization technique. *Aquaculture*, 388:115-121.

De Minicis S y Brenner DA (2008). Oxidative stress in alcoholic liver disease:role of NADPH oxidase complex. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 23:S98-S103.

De Paula Silva FC, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ, (2011). Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). *FEMS Microbiology Ecology*, 78:285-296.

De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, Baruah K, Verstraete W, Boon N, Gudrun De Boeck G, Bossier P (2010). Poly- β hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Applied in Microbiology Biotechnology*, 86:1535–1541.

Denev Y, Staykov R, Moutafchieva B, Beev (2009). Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture, *International Aquaculture Research*, 1:1-29.

Dhanasiri AK, Brunvold L, Brinchmann MF, Korsnes K, Bergh Ø, Kiron V (2011). Changes in the intestinal microbiota of wild Atlantic cod *Gadus morhua* L. upon captive rearing. *Microbial Ecology*, 61:20-30.

Dhiman RK (2013). Gut microbiota and hepatic encephalopathy. *Metabolism Brain Disease*, 28:321-326.

Dias J, Rueda-Jasso R, Panserat S, Conceicao LEC, Gomes EF, Dinis MT (2004). Effect of dietary carbohydrate-to lipid ratios on growth, lipid deposition and metabolic hepatic enzymes in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup). *Aquaculture Research*, 35:1122-1130.

Díaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A, Cuesta A, Chabrilón M, Balebona MC, Moriño MA, Esteban M, Messeguer J (2006). Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish and Shellfish Immunology*, 20:482–492.

Díaz-Rosales P, Arijó S, Chabrilón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua ST, Martínez-Manzanas E, Balebona MC, Moriño MA (2009). Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 293:16–21.

Dijkstra AR, Setyawati MC, Bayjanov JR, Alkema W, van Hijum SA, Bron PA, Hugenholtz J (2014). Diversity in robustness of *Lactococcus lactis* strains during heat stress, oxidative stress, and spray drying stress. *Applied and Environmental Microbiology*, 80:603-611.

Dimitroglou A, Merrifield DL, Spring P, Sweetman J, Moate R, Davies SJ (2010). Effects of mannan oligosaccharide (MOS) supplementation on growth performance, feed

utilisation, intestinal histology and gut microbiota of gilthead sea bream (*Sparus aurata*). *Aquaculture*, 300:182-188.

Dimitroglou A, Merrifield DL, Carnevali O, Picchietti S, Matteo Avella M, Carly Daniels C, Güroy D, Davies S (2011). Microbial manipulations to improve fish health and production. A Mediterranean perspective. *Fish and Shellfish Immunology*, 30:1-16.

Dinis MT, Ribeiro L, Soares F, Sarasquete C (1999). A review on the cultivation potential of *Solea senegalensis* in Spain and in Portugal. *Aquaculture*, 176:27-38.

Dock-Nascimento DB, Junqueira K, Aguilar-Nascimento JE (2007). Rapid restoration of colonic goblet cells induced by a hydrolyzed diet containing probiotics in experimental malnutrition. *Acta Cirurgica Brasileira*, 22:72-76.

Dorsey D y Robertson W (2013). Recent Advances in Fish Diseases Treatment: Probiotics as Alternative Therapy to Antibiotics in Aquaculture. *European Journal of Ocean and Marine*, 11:20-27.

Drake P y Arias AM (1989). Hábitos alimentarios de estados juveniles de peces en los caños de las salinas de Cádiz. In *Acuicultura Intermareal*. M. Yúfera (eds). Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía. Cádiz. 249-257.

Duarte S, Zauli DAG, Nicoli JR, Araújo FG (2014). Gram-negative intestinal indigenous microbiota from two Siluriform fishes in a tropical reservoir. *Brazilian Journal of Microbiology*, 45:1283-1292.

El-Nobi GA, Reda RM, Hassanin ME, Elmowalid G (2009). The impact of applications of probiotic *Bacillus subtilis* on health and growth of koi carp *Cyprinus carpio*. *Proceeding of the 2nd Global Fisheries and Aquaculture Research Conference*.

Engrola S, Conceicao LEC, Gavaia PJ, Cancela ML, Dinis MT (2005). Effects of pre-weaning feeding frequency on growth, survival and deformation of senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *The Israeli Journal of Aquaculture-Bamidgeh*, 57:10-18.

Engrola E, Conceicao LEC, Dias L, Pereira R, Ribeiro L, Dinis MT (2007). Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquaculture Research*, 38:696-707.

Engrola S, Figueira L, Conceição LEC, Gavaia PJ, Ribeiro L, Dinis MT (2009). Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. *Aquaculture*, 288:264-272.

Erkosar B, Storelli G, Defaye A, Leulier F (2013). Host-intestinal microbiota mutualism: "learning on the fly". *Cell Host and Microbe*, 13:8-14.

Esteban MA, Chaves-Pozo E, Arizcun M, Meseguer J, Cuesta A (2013). Regulation of natural killer enhancing factor (NKEF) genes in teleost fish, gilthead seabream and European sea bass. *Molecular Immunology*, 55:275-282.

Esteban MA, Cordero H, Martínez-Tomé M, Jimenez-Monreal AM, Bakhrouf A, Mahdhi A (2014). Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosa of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 39:532-540.

FAO, 2012. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2012. Departamento de Pesca de la FAO, Roma (Italia).

FAO, 2014. El Estado Mundial de la Pesca y la Acuicultura 2014. Departamento de Pesca de la FAO, Roma (Italia).

Felske A, Akkermans AD, de Vos WM (1998). Quantification of 16S rRNAs in complex bacterial communities by multiple competitive reverse transcription-PCR in temperature gradient gel electrophoresis fingerprints. *Applied Environmental Microbiology*, 64:4581-4587.

Feng JB, Luo P, Dong JD, Hu CQ (2011). Intestinal microbiota of mangrove red snapper (*Lutjanus argentimaculatus* Forsskal, 1775) reared in sea cages. *Aquaculture Research*, 42:1703-1713.

Ferguson RMW, Merrifield DL, Harper GM, Rawling MD, Mustafa S, Picchiatti, Balcázar JL, Davies SJ (2010). The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Journal of Applied Microbiology*, 109:851-862.

Fernandes TJR, Alves RC, Souza T, Silva JMG, Castro-Cunha M, Valente LMP, Oliveira MBPP (2012). Lipid content and fatty acid profile of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) juveniles as affected by feed containing different amounts of plant protein sources. *Food Chemistry*, 134:1337-1342.

Fernández I, Pimentel MS, Ortiz-Delgado JB, Hontoria F, Sarasquete C, Estévez A, Zambonino-Infante JL, Gisbert E (2009). Effect of dietary vitamin A on Senegalese sole (*Solea senegalensis*) skeletogenesis and larval quality. *Aquaculture*, 295:250-265.

Fernández-Díaz C, Yúfera M, Cañavate JP, Moyano FJ, Alarcón FJ, Díaz M (2001). Growth and physiological changes during metamorphosis of Senegal sole reared in the laboratory. *Journal of Fish Biology*, 58:1086-1097.

Fernández-Díaz C, Kopecka J, Cañavate JP, Sarasquete C, Solé M (2006). Variations on development and stress defences in *Solea senegalensis* larvae fed on live and microencapsulated diets. *Aquaculture*, 251:573-584.

Fidopiastis PM, Bezdek DJ, Horn MN, Kandel JS (2006). Characterizing the Resident, Fermentative microbial consortium in the hindgut of the temperate zone herbivorous fish *Hermosilla azurea* (Teleostei: *Kyphosidae*). *Marine Biology*, 148:631-642.

Finn R, Ahmad T, Coffey ET, Brayden DJ, Baird AW, Boyd A (2014). Translocation of *Vibrio parahaemolyticus* across an *in vitro* M cell model. *FEMS Microbiology Letter*, 350:65-71.

Fjellheim AJ, Klinkenberg G, Skjermo J, Aasen IM, Vadstein O (2010). Selection of candidate probionts by two different screening strategies from Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) larvae. *Veterinary Microbiology*, 144:153-159.

Fletcher GL y Rise ML (2012). *Aquaculture biotechnology*. John Wiley & Sons (Eds).

Fotedar R y Phillips B (Eds.). (2011). *Recent advances and new species in aquaculture*. John Wiley & Sons.

Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, Brenner DA, Schnabl B (2012). Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease. *Journal of Hepatology*, 56:1283-1292.

Franke A, Roth O, Clemmesen C (2013a). Early stimulation of the immune system of an important aquaculture fish species: Probiotic application in European sea bass juveniles. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1707.

Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, Teysier-Cuvelle S, Gillet F, Aragno M, Rossi P (2002). Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environmental Microbiology*, 4:634-643.

Gamboa-Delgado J, Cañavate JP, Zeroło R, Le Vay L (2008). Natural carbon stable isotope ratios as indicators of the relative contribution of live and inert diets to growth in larval Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 280:190-197.

Gamboa-Delgado J, Le Vay L, Fernández-Díaz C, Cañavate P, Ponce M, Zeroło R, Manchado M (2011). Effect of different diets on proteolytic enzyme activity, trypsinogen gene expression and dietary carbon assimilation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 158:251-258.

Ganguly S y Prasad A (2012). Microflora in fish digestive tract plays significant role in digestion and metabolism. *Reviews in Fish Biology and Fisheries*, 22:11-16.

García de la Banda I, Lobo C, Martín I, Moriñigo MA, Tapia-Paniagua S, Chabrillón M, León-rubio JM, Arijó S, Moreno-Ventas X (2009). Enhancement of larval and postlarval Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) culture by *Shewanella* Pdp11 probiotic addition. *Aquaculture Europe*, Trondheim (Noruega).

García de La Banda I, Lobo C, León-Rubio JM, Tapia-Paniagua ST, Balebona MC, Moriñigo MA, Moreno-Ventas X, Lucas L, Linares F, Arce F, Arijó S (2010a). Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture*, 306:281-288.

García de la Banda I, Lobo C, Lucas ML, et al (2010b). Influence of different ways of administration (fresh and lyophilized) of Pdp11 *Shewanella putrefaciens* on growth and performance of sole juveniles (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). *Aquaculture Europe*, Oporto (Portugal).

García de la Banda I, Lobo C, Lucas LM, Moreno-Ventas X, Mira JR, Medina- López A, y col. (2011) *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes welfare and confers resistance against pathogens on *Solea senegalensis* juveniles cultured at low and high densities. V International sole Workshop, Faro (Portugal).

García de la Banda I, Lobo C, Chabrilón M, León-Rubio JM, Arijo S, Pazos G, Lucas LM, Moriño MA (2012). Influence of dietary administration of a probiotic strain *Shewanella putrefaciens* on senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. Aquaculture Research, 43:662-669.

García de la Banda García I (2013). Efecto de la adición de dos probióticos (*Shewanella putrefaciens* y *Shewanella baltica*) en el engorde del lenguado senegalés (*Solea senegalensis* Kaup, 1858). Tesis doctoral. Universidad de León. León. España.

García-López A, Fernández-Pasquier V, Couto E, Canario AVM, Sarasquete C, Martínez-Rodríguez G, (2006). Testicular development and plasma sex steroid levels in cultured male Senegalese sole, *Solea senegalensis*, Kaup. General and Comparative Endocrinology, 147:343-351.

García-Millán I, León-Rubio JM, Rosas-Ledesma P, Tapia-Paniagua ST, Arijo S (2009) Detection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* proteins involved in the specific immune response of sole (*Solea senegalensis*) and cross reactivity with probiotics. 14th international conference of European Association of Fish Pathologists, Praga (República Checa).

Gatesoupe FJ (2008). Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. Journal Molecular Microbiology Biotechnology, 14:107-114.

Gatesoupe FJ, Burnell G, Allan G (2009). Diet and husbandry techniques to improve disease resistance: new technologies and prospects. New technologies in aquaculture: improving production efficiency, quality and environmental management, 267-311.

Gentile G, Bonasera V, Amico C, Giulano L, Yakimov MM (2003). *Shewanella* sp. GA-22, a psychrophilic hydrocarbonoclastic anctartic bacterium producing polyunsaturated fatty acids. Journal of Applied Microbiology, 96:1124-1133.

Georgopoulou U, Dimitriadis A, Foka P, Karamichali E, Mamalaki A (2014). Hepcidin and the iron enigma in HCV infection. Virulence, 5: 465-476.

Gerzova L, Videnska P, Faldynova M, Sedlar K., Provaznik I, Cizek A, Rychlik I (2014). Characterization of microbiota composition and presence of selected antibiotic resistance genes in carriage water of ornamental fish. DOI: 10.1371/journal.pone.0103865.

Giannenas I, Karamaligas I, Margaroni M, Pappas I, Mayer E, Encarnação P, Karagouni E (2015). Effect of dietary incorporation of a multi-strain probiotic on growth performance and health status in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Fish Physiology and Biochemistry, 41:119-128.

Giri SS, Sen SS, Sukumaran V (2012). Effects of dietary supplementation of potential probiotic *Pseudomonas aeruginosa* VSG-2 on the innate immunity and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology, 32:1135-1140.

Giri SS, Sukumaran V, Oviya M (2013). Potential probiotic *Lactobacillus plantarum* VSG3 improves the growth, immunity, and disease resistance of tropical freshwater fish, *Labeo rohita*. Fish and Shellfish Immunology, 34:660-666.

Girones R, Jofre JT, Bosch A (1989). Isolation of marine bacteria with antiviral properties. Canadian Journal of Microbiology, 35:1015-1021.

Goarant C y Merien F (2006). Quantification of *Vibrio penaeicida*, the ethiological agent of syndrome 93 in New Caledonian shrimp by real-time PCR using SYBR Green I chemistry. Journal of Microbiological Methods, 67:27-35.

Goksoyr BT (1990). Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in the sea water by complex formation with magnesium and calcium. Diseases of Aquatic Organisms, 9:67-72.

Gómez GD y Balcázar JL (2008). A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunology and Microbiology, 52:145–154.

Gómez-Leon J, Villamil L, Lemos ML, Novoa B, Figueras A (2005) isolation of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio splendidus* from aquacultured carpet shell clam (*Ruditapes decussatus*) larvae associated with mass mortalities. Applied and Environmental Microbiology, 71:98-104.

Goyal N, Eishi P, Shukla G (2013). *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study. World Journal of Microbiology and Biotechnology, 29:1049-1057.

Green SJ, Leigh MB, Neufeld JD (2010). Denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) for microbial community analysis. In Handbook of Hydrocarbon and Lipid Microbiology. Springer Berlin Heidelberg, 4137-4158

Green TJ, Smullen R, Barnes AC (2013). Dietary soybean protein concentrate-induced intestinal disorder in marine farmed Atlantic salmon, *Salmo salar* is associated with alterations in gut microbiota. Veterinary Microbiology, 166:286-292.

Greene BT, Thorburn J, Willingham MC, Thorburn A, Planalp RP, Brechbiel MW, Jennings-Gee J, Wilkinson J, Torti FM, Torti SV (2012). Activation of caspase pathways during iron chelator-mediated apoptosis. Journal of Biological Chemistry, 277:25568- 25575.

Grenier D, Huot MP, Mayrand D (2000). Iron-chelating activity of Tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics. Antimicrobial Agents Chemotherapy, 44:763-766.

Grześkowiak Ł, Collado MC, Salminen S (2012). Evaluation of aggregation abilities between commensal fish bacteria and pathogens. Aquaculture, 356:412-414.

Griffiths BS, Bonkowski M, Roy J, Ritz K (2001). Functional stability, substrate utilization and biological indicators of soils following environmental impacts. *Applied Soil Ecology*, 16:49–61.

Guardiola FA, Cerezuela R, Meseguer J, Esteban MA (2012). Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline. *Aquaculture*, 334:51-57.

Guarner F y Malagelada J (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet*, 36:512–519.

Gudding R y Van Muiswinkel WB (2013). A history of fish vaccination: Science-based disease prevention in aquaculture. *Fish and Shellfish Immunology*, 35:1683-1688.

Gudding R (2014). Vaccination as a preventive measure. *Fish Vaccination*, (eds R. Gudding, A. Lillehaug and Ø. Evensen), John Wiley & Sons.

Guerreiro I, Peres H, Castro-Cunha M, Oliva-Teles A (2012). Effect of temperature and dietary protein/lipid ratio on growth performance and nutrient utilization of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition*, 18:98-106.

Guichard B y Licek E (2006). A comparative study of antibiotics registered for use in farmed fish in European countries. I OIE Global Conference on Aquatic Animal Health, Bergen (Noruega).

Guo L y Li Z (2003). Effects of nitrogen and phosphorus from fish cage-culture on the communities of a shallow lake in middle Yangtze River basin of China. *Aquaculture*, 226:201-212.

Guo S, Wharton W, Moseley P, Shi H (2007). Heat shock protein 70 regulates cellular redox status by modulating glutathione-related enzyme activities. *Cell Stress and Chaperones*, 12:245.

Guzmán JM, Norberg B, Ramos J, Mylonas C, Mañanos E (2008). Vitellogenin, steroid plasma levels and spawning performance of cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *General and Comparative Endocrinology*, 156:285-297.

Guzmán JM, Ramos J, Mylonas CC, Mañanos E (2009). Spawning performance and plasma levels of GnRHa and sex steroid in cultured female Senegalese sole (*Solea senegalensis*) treated with different GnRHa-delivery systems. *Aquaculture*, 291:200-209.

Guzmán-Villanueva LT, Tovar-Ramírez D, Gisbert E, Cordero H, Guardiola FA, Cuesta A, Meseguer J, Ascensio-Valle F, Esteban MA (2014). Dietary administration of β -1, 3/1, 6-glucan and probiotic strain *Shewanella putrefaciens*, single or combined, on gilthead seabream growth, immune responses and gene expression. *Fish and Shellfish Immunology*, 39:34-41.

Haque SA, Reza MS, Sharker MR, Rahman MM, Islam MA (2014). Effectiveness of oxytetracycline in reducing the bacterial load in rohu fish (*Labeo rohita*, Hamilton) under laboratory culture condition. *Journal of Coastal Life Medicine*, 2:259-263.

Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, Das S, Chowdhury N, Hinenoya A, Asakura M, Yamasaki S (2011). Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an *Artemia* model. Microbiology, 157:179-88.

Hammer Ø, Harper D, Ryan P (2001). Past: Paleontological Statistics Software Package for Education and Data Analysis. Palaeontologia Electronica, 4:4-9.

Hamre K, Yúfera M, Rønnestad I, Boglione C, Conceição LE, Izquierdo M (2013). Fish larval nutrition and feed formulation: knowledge gaps and bottlenecks for advances in larval rearing. Reviews in Aquaculture, 5:26-58.

Hansen GH y Olafsen JA (1999). Bacterial Interactions in early life stages of marine cold water fish. Microbial Ecology, 38:1-26.

Harbige LS (2003). Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. Lipids, 38: 323-341.

Harikrishnan R, Balasunaram C, Heo MS (2010). Effect of probiotics enriched diet on *Paralichthys olivaceus* infected with lymphocystis disease virus (LCDV). Fish and Shellfish Immunology 29:868-874

Harikrishnan R, Kim MC, Kim JS, Balasundaram C, Heo MS (2011). Immunomodulatory effect of probiotics enriched diets on *Uronema marinum* infected olive flounder. Fish and Shellfish Immunology, 30:964-971.

He S, Zhou Z, Liu Y, Shi P, Yao B, Ringø E, Yoon I (2009). Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus*♀ × *O. aureus*♂) cultured in cages. Aquaculture, 294:99-107.

He S, Zhang Y, Xu L, Yang Y, Marubashi T, Zhou Z, Yao B (2013). Effects of dietary *Bacillus subtilis* C-3102 on the production, intestinal cytokine expression and autochthonous bacteria of hybrid tilapia *Oreochromis niloticus*♀ × *Oreochromis aureus*♂. Aquaculture, 412:125-130.

Heikkinen J, Vielma J, Kemilainen O, Riirola M, Eskelinen P, Kiuru T, Navia-Paldanius D, Vond Wright A (2006). Effects of soybean meal based diet on growth performance, gut histopathology and intestinal microbiota of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquaculture, 261:259-268.

Hernandes-Gea V, Hilscher M, Rozenfeld R, Lim MP, Nieto N, Werner S, Devi LA, Friedman SL (2013). Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy. Journal of Hepatology, 59:98-104.

Herrera M, Aragão C, Hachero I, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Mancera JM, Conceição LE (2012). Physiological short-term response to sudden salinity change in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Fish Physiology and Biochemistry, 38:1741-1751.

Heuer OE, Kruse H, Grave K, Collignon P, Karunasagar I, Angulo FJ (2009). Human health consequences of use of antimicrobial agents in aquaculture. *Clinical Infectious Diseases*, 49:1248-1253.

Hirota K, Nodasaka Y, Orikasa Y, Okuyama H, Yumoto I (2005). *Shewanella pneumatophori* sp. nov., an eicosapentaenoic acid-producing marine bacterium isolated from the intestines of Pacific mackerel (*Pneumatophorus japonicus*). *International Journal of Systematic Evolutionary Microbiology*, 55:2355–2359.

Høj L, Bourne DG, Hall MR (2009). Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. *Aquaculture*, 293:278–285.

Holmstrøm K y Gram L (2003). Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2, using RNA-arbitrarily primed PCR. *Journal of Bacteriology*, 185: 831-842.

Holland JW, Taylor GW, Rowley AF (1999). The eicosanoid generating capacity of isolated cell populations from the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comparative Biochemistry Physiology Part C*, 122:297-306.

Hooper LV, Littman DR, Macpherson AJ (2012). Interactions between the microbiota and the immune system. *Science*, 336:1268-1273.

Hovda MB, Fontanillas R, McGurk C, Obach A, Rosnes JT (2012). Seasonal variations in the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Aquaculture Research*, 43:154-159.

Hsieh YP, Huang CH, Lee CY, Lin CY, Chang CC (2014). Silencing of hepcidin enforces the apoptosis in iron-induced human cardiomyocytes. *Journal of Occupational Medicine and Toxicology*. DOI: 10.1186/1745-6673-9-11.

Huber I, Spanggaard B, Appel KF, Rossen L, Nielsen T, Gram L (2004). Phylogenetic analysis and in situ identification of the intestinal microbial community of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 96:117-132.

Hunninghake GW, Doerschug KC, Nyman AB, Schmidt GA, Meyerholz DK, Ashare A. Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis. *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine*, 182:517-525.

Ibrahim M y Anishetty S (2012). A meta-metabolome network of carbohydrate metabolism: Interactions between gut microbiota and host. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 428:278-284.

Ibrahim F y Vesterlund S (2014). *Lactococcus lactis* ssp. *lactis* as protective culture in vacuum-packed raw salmon (*Salmo salar*). *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 23:601-607.

Ide T (2000). Effect of dietary alpha-linolenic acid on the activity and gene expression of hepatic fatty acid oxidation enzymes. *Biofactors*, 13:9–14.

Imsland AK, Foss A, Conceicao LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P (2003). A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. Reviews in Fish Biology and Fisheries, 13:379-408.

Infante C, Matsuoka MP, Asensio E, Cañavate JP, Reith M, Manchado M (2008). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae studies in larvae from flatfish using real-time PCR. BMC Molecular Biology, 9:28.

Ingerslev HC, von Gersdorff Jorgensen L, Lenz-Strube M, Larsen N, Dalsgaard I, Boyne M, Madsen L (2014). The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. Aquaculture, 424–425:24–34.

Irianto A, Robertson PAW, Austin B (2003). Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3–51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). Journal of Fish Diseases, 26:117–120.

Isolauri E, Sütas Y, Kankaanpää P, Arvilommi H, Salminen S (2001). Probiotics: Effects on immunity. The American Journal of Clinical Nutrition, 73:444-450.

Izvekova IG, Izvekov EI, Plotnikov AO (2007). Symbiotic microflora in fishes of different ecological groups. Biology Bulletin, 34:728-737.

Jernberg C, Löfmark S, Edlund C, Jansson JK (2010). Long-term impacts of antibiotic exposure on the human intestinal microbiota. Microbiology, 156: 3216-3223.

Jiang J, Shi Y, Shan Z, Yang L, Wang X, Shi L (2012). Bioaccumulation, oxidative stress and HSP70 expression in *Cyprinus carpio* L. exposed to microcystin-LR under laboratory conditions. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology, 155: 483-490.

Jiménez-Fernández E, Ponce M, Zuasti E, Fernández-Díaz C, Manchado M, Infante C (2012). Molecular characterization and transcriptional regulation of the sodium-dependent vitamin C transporter genes (slc23a1 and slc23a2) in a teleost fish, the Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 161:208-218.

Jiménez-Fernández E, Ponce M, Rodríguez-Rúa A, Zuast E., Manchado M, Fernández-Díaz C (2015). Effect of dietary vitamin C level during early larval stages in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Aquaculture, 443:65-76.

Jobling M (2015). Fish nutrition research: past, present and future. Aquaculture International, 1-20.

Jousset A, Lara E, Nikolausz M, Harms H, Chatzinotas A (2010). Application of the denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) technique as an efficient diagnostic tool for ciliate communities in soil. Science of the Total Environment, 408:1221-1225.

Jukes TH, y Cantor CR (1969). Evolution of protein molecules. Mammalian Protein Metabolism, 3:21-132.

Jung Y, Miura M, Yuan J (1996). Suppression of interleukin-1 beta-converting enzyme-mediated cell death by insulin-like growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 271:5112–5117.

Jurado J, Fuentes-Almagro CA, Prieto-Álamo MJ, Pueyo C (2007). Alternative splicing of c-fos pre-mRNA: contribution of the rates of synthesis and degradation to the copy number of each transcript isoform and detection of a truncated c-Fos immunoreactive species. *BMC Molecular Biology*, 8:83.

Jutfelt F, Olsen RE, Glette J, Ringø E, Sundell K (2006). Translocation of viable *Aeromonas salmonicida* across the intestine of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 29:255-262.

Kaila M, Isolauri E, Saxelin M, Arvilommi H, Vesikari T (1995). Viable versus inactivated *Lactobacillus* strain GG in acute rotavirus diarrhoea. *Archives of Disease in Childhood*, 72:51-53.

Kanther M y Rawls JF (2010). Host-microbe interactions in the developing zebrafish. *Current Opinion Immunology*, 22:10–19.

Kasana RC, Salwan R, Yadav SK (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Critical Reviews in Microbiology*, 37:262-276.

Kashem MA, Uddin MN, Hossain MM, Hasan MT, Haque SA, Khan MNA, Hossain A (2014). Effect of Oxytetracycline on bacterial load of *Labeo rohita* (Rohu) fish in culture pond. *Global Advanced Research Journals*, 3:018-024.

Kesarcodi-Warson A, Kaspar H, Lategan MJ, Gilson L (2008). Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. *Aquaculture*, 274:1–14.

Khouadja S, Lamari F, Bakhrouf A (2013). Characterization of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from farmed sea bass (*Dicentrarchus labrax*) during disease outbreaks. *International Aquaculture Research*, 5:13.

Khuntia CP, Das BK, Samantaray BR, Samal SK, Mishra BK (2008). Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). *Aquaculture Research*, 39:301-310.

Kim YS y Ho SB (2010). Industrial goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Current of Gastroenterology*, 12:319-330.

Kim SY, Kim S R, Oh MJ, Jung SJ, Kang SY (2011). *In vitro* antiviral activity of red alga, *Polysiphonia morrowii* extract and its bromophenols against fish pathogenic infectious hematopoietic necrosis virus and infectious pancreatic necrosis virus. *The Journal of Microbiology*, 49:102-106.

Kim DH y Kim DY (2013). Microbial diversity in the intestine of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) *Aquaculture*, 414:103-108.

Kiron V, Fukuda H, Takeuchi T, Watanabe T (1995). Essential fatty acid nutrition and defence mechanisms in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology, 111:361-367.

Knapp JS y Bromley-Challoner KCA (2003). 34-Recalcitrant Organic Compounds, Handbook of Water and Wastewater Microbiology. Academic Press, London, 559-595.

Koga T, Mizobel T, Takumi K (1998). Antibacterial activity of *Lactobacillus* species against *Vibrio* species. Microbiological Research, 153:271-275.

Konstantinov SR, Awati AA, Williams BA, Miller BG, Jones P, Stokes CR, De Vos WM (2006). Post-natal development of the porcine microbiota composition and activities. Environmental Microbiology, 8:1191-1199.

Kulakova L, Galkin A, Kurihara T, Yoshimura T, Esaki N (1999). Cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* strain Ac10: gene cloning and enzyme purification and characterization. Applied and Environmental Microbiology, 65:611-617.

Kulakova L, Galkin A, Nakayama T, Nishino T, Esaki N (2003). Improvement of thermostability of cold-active serine alkaline protease from the psychrotrophic bacterium *Shewanella* sp. strain Ac10 by rational mutagenesis. Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 22:113-117.

Kumar NR, Raman RP, Jadhao SB, Brahmchari RK, Kumar K, Dash G (2013). Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (deMan, 1879). Aquaculture International 21:387-403.

Kumar Y, Chisti B, Singh AK, Masih H y Mishra SK (2013). Isolation and characterization of *Lactobacillus* species from fish intestine for probiotic properties. International Journal of Pharma and BioScience, 4:11-21.

Labreuche Y, Pallandre L, Ansquer D, Herlin J, Wapotre B, Le Roux F (2012). Pathotyping of *Vibrio* isolates by multiplex PCR reveals a risk of virulent strain spreading in New Caledonian shrimp farms. Microbial Ecology, 63:127-138.

Lamari F, Castex M, Larcher T, Ledevin M, Mazurais D, Bakhrouf A, Gatesoupe J (2013). Comparison of the effects of the dietary addition of two lactic acid bacteria on the development and conformation of sea bass larvae, *Dicentrarchus labrax*, and the influence on associated microbiota. Aquaculture, 376:137-145.

Lamari F, Sadok K, Bakhrouf A, Gatesoupe FJ (2014). Selection of lactic acid bacteria as candidate probiotics and *in vivo* test on *Artemia nauplii*. Aquaculture International, 22:699-709.

LaPatra SE, Fehringer TR, Cain KD (2014). A probiotic *Enterobacter* sp. provides significant protection against *Flavobacterium psychrophilum* in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after injection by two different routes. Aquaculture, 433:361-366.

Lara-Flores M (2011). The use of probiotic in aquaculture: an overview. *International Research Journal of Microbiology*, 2:471-478.

Lauzon HL, Magnusson H, Sveinsdottir K, Gudjonsdottir M, Martinsdottir E (2009). Effect of brining, modified atmosphere packaging, and superchilling on the shelf life of cod (*Gadus morhua*) loins. *Journal of Food Science*, 74:M258–M267.

Lauzon HL, Gudmundsdottir S, Steinarsson A, Oddgeirsson M, Petursdottir SK, Reynisson E, Bojornsdottir R, Gudmundsdottir BK (2010). Effects of bacterial treatment at early stages of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) on larval survival and development. *Journal of Applied Microbiology*, 108:624-632.

Lazado CC, Caipang CMA, Rajan B, Brinchmann MF, Kiron V (2010). Characterization of GP21 and GP12: two potential probiotic bacteria isolated from the gastrointestinal tract of Atlantic cod. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 2:126-134.

Lazado C y Caipang CMA (2014). Mucosal immunity and probiotic in fish. *Fish and Shellfish Immunology*, 39:78-89.

Lee YK, Ho PS, Low CS, Arvilommi H, Salminen S (2004). Permanent colonization by *Lactobacillus casei* is hindered by the low rate of cell division in mouse gut. *Applied and Environmental Microbiology*, 70:670-674.

Lee JS, Cheng H, Damte D, Lee SJ, Kim JC, Rhee MH, Sun JW, Park SC (2013). Effects of dietary supplementation of *Lactobacillus pentosus* PL11 on the growth performance, immune and antioxidant systems of Japanese eel *Anguilla japonica* challenged with *Edwardsiella tarda*. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:756-761.

Likotrafti E, Tuohy KM, Gibson GR, Rastall RA (2013). Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*. *Anaerobe*, 20:5-13.

Lin HZ, Guo Z, Yang Y, Zheng W, Li ZJ (2004). Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. *Aquaculture Research*, 35:1441-1447.

Liu PC, Lin JY, Chuang WH, Lee KK (2004). Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastroenteritis syndrome. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20:495-499.

Liu KF, Chiu CH, Shiu YL, Cheng W, Liu CH (2010). Effects of the probiotic, *Bacillus subtilis* E20, on the survival, development, stress tolerance, and immune status of white shrimp, *Litopenaeus vannamei* larvae. *Fish and Shellfish Immunology*, 28:837-844.

Livak KJ y Schmittgen TD (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-Time Quantitative PCR and the $2\Delta\Delta CT$ Method. *Methods*, 25:402-408.

Llewellyn MS, Boutin S, Hoseinifar SH, Derome N (2014). Teleost microbiomes: the state of the art in their characterization, manipulation and importance in aquaculture and fisheries. *Frontiers in Microbiology*, 5:207.

Lobo C, García de la Banda I, León-Rubio JM, y col. (2010). Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture. Abstracts of Aquaculture Europe, Oporto (Portugal).

Lobo C, Moreno-Ventas X, Tapia-Paniagua S, Rodríguez C, Moriñigo MA, de García de la Banda I, (2014a). Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry*, 40:295-309.

Lobo C, Tapia-Paniagua S, Moreno-Ventas X, Alarcón FJ, Rodríguez C, Moriñigo MA, García de la Banda I, Balebona MC (2014b). Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture*, 433:183-195.

López-Cazorla A, Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA (2014). Evaluation of *Lactobacillus paracasei* subsp. *tolerans* isolated from Jenyn's sprat (*Ramnogaster arcuata*) as probiotic for juvenile rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum, 1792). *Journal of Applied Ichthyology*, 31:88-94.

Lorenzen N y LaPatra SE (2014). DNA vaccines for aquacultured fish. *Revue Scientifique Et Technique-Office International Des Epizooties*, 24:201-213.

Louro B, Power DM, Canario AV (2014). Advances in European sea bass genomics and future perspectives. *Marine Genomics*, 78:71-75.

Lunestad BT y Goksøyr J (1990). Reduction in the antibacterial effect of oxytetracycline in sea water by complex formation with magnesium and calcium. *Diseases of Aquatic Organisms*, 9:67-72.

Macpherson HL, Bergh Ø, Birkbeck TH (2012). An aerolysin-like enterotoxin from *Vibrio splendidus* may be involved in intestinal tract damage and mortalities in turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), and cod, *Gadus morhua* L., larvae. *Journal of Fish Diseases*, 35:153-167.

Magariños B, Romalde JL, López-Romalde S, Moriñigo MA, Toranzo AE (2003). Pathobiological characterisation of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 23:183-190.

Magnadottir B (2010). Immunological control of fish diseases. *Marine biotechnology*, 12:361-379.

Mahious AS, Gatesoupe FJ, Hervi M, Metailler R, Ollevier F (2006). Effect of dietary inulin and oligosaccharides as prebiotics for weaning turbot, *Psetta maxima* (Linnaeus, C. 1758), *Aquaculture International*, 14:219-229.

Mai MG, Engrola S, Morais S, Portella MC, Verani JR, Dinis MT, Conceicao LE (2009). Co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding affects *Artemia* lipid digestibility and retention in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 296:284-291.

Maidak BL, Cole JR, Parker CT, Garrity GM, Larsen N, Li B, Lilburn TG, McCaughey MJ, Olsen GJ, Overbeek R, Pramanik S, Schimdt TM, Tiedje JM, Woese CR (1999). A new version of the RDP (*Ribosomal Database Project*). *Nucleic Acids Research*, 27:171-173.

Makridis P, Martins S, Tsalavouta M, Dionisio LC, Kotoulas G, Magoulas A, Dinis MT (2005). Antimicrobial activity in bacteria isolated from Senegalese sole, *Solea senegalensis*, fed with natural prey. *Aquaculture Research*, 36:1619-1627.

Makridis P, Martins S, Reis J, Dinis MT (2008). Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture Research*, 39:627-634.

Manchado M, Infante C, Asensio E, Crespo A, Zuasti E, Cañavate JP (2008a). Molecular characterization and gene expression of six trypsinogens in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) during larval development and in tissues. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 149:334-44.

Manchado M, Salas-Leiton E, Infante C, Ponce M, Asensio E, Crespo A, Zuasti E, Cañavate JP (2008b). Molecular characterization, gene expression and transcriptional regulation of cytosolic HSP90 genes in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Gene*, 416:77-84.

Mantyka CS y Bellwood DR (2007) Macroalgal grazing selectivity among herbivorous coral reef fishes. *Marine Ecology – Progress Series*, 352:177-185.

Marinho G, Peres H, Carvalho AP (2012). Effect of feeding time on dietary protein utilization and growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Research*, 45:828-833.

Marinho G, Peres H, Carvalho AP (2014). Effect of feeding time on dietary protein utilization and growth of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Research*, 45:828-833.

Marsh TL (1999). Terminal restriction fragment length polymorphism (T-RFLP) an emerging method for characterizing diversity among homologous populations of amplification products. *Current Opinion in Microbiology*, 2:323-327.

Marshall BM y Levy SB (2011). Food animals and antimicrobials: impacts on human health. *Clinical Microbiology Reviews*, 24:718-733.

Martín-Antonio B, Manchado M, Infante C, Zero R, Labella A, Alonso C, Borrego JJ (2007). Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. *Aquaculture Research*, 38:1213-1222

Martin-Antonio B, Jimenez-Cantizano RM, Salas-Leiton E, Infante C, Manchado M (2009). Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the redbanded seabream (*Pagrus auriga*). *Fish and Shellfish Immunology*, 26:483-491.

Martín-Laurent F, Philippot L, Hallet S, Chaussod R, Germon JC, Soulas G, Castroux G (2001). DNA extraction from soils: old bias for new microbial diversity analysis methods. *Applied and Environmental Microbiology*, 67:2354-2359.

Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S (1998). Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques*, 24:138-139.

Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008). How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environmental Microbiology*, 10:1571-1581.

Matthews CC y Feldman EL (1996). Insulin-like growth factor I rescues SH-SY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death. *Journal of Cellular Physiology*, 166:323-331.

Maule AG, Shaw C, Halton DW, Johnston CF, Fairweather (1989). Localization, quantification, and characterization of pancreatic polypeptide immunoreactivity in the parasitic flatworm *Diclidophora merlangi* and its fish host (*Merlangius merlangus*). *General and Comparative Endocrinology*, 74:50-56.

Mauri I, Romero A, Acerete L, MacKenzie S, Roher N, Callol A, Cano I, Alvarez MC, Tort, L (2011). Changes in complement responses in Gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish and Shellfish Immunology*, 30:182-188.

Mazeaud MM, Mazeaud F, Donaldson EM (1977). Primary and secondary effects of stress in fish: some new data with a general review. *Transactions of the American Fisheries Society*, 106:201-212.

Meaden GJ y Aguilar-Manjarrez J (2013). Advances in geographic information systems and remote sensing for fisheries and aquaculture. Food and Agriculture Organization of the United Nations.

Meena DK, Das P, Kumar S, Mandal SC, Prusty AK, Singh SK, y col., (2013). Beta-glucan: an ideal immunostimulant in aquaculture (a review). *Fish Physiology and Biochemistry*, 39:431-457.

Mehrim (2009). Effect of Dietary Supplementation of Biogen® (Commercial Probiotic) on Mono-Sex Nile tilapia *Oreochromis niloticus* under Different Stocking Densities. *Journal of Fisheries and Aquatic Science*, 4:261-273.

Merrifield DL, Burnard D, Bradley G, Davies SJ, Baker RTM (2009a). Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Research*, 40:1064-1072.

Merrifield DL, Dimitroglou A, Bradley G, Baker RTM, Davies SJ (2009b). Soybean meal alters autochthonous microbial populations, microvilli morphology and compromises intestinal enterocyte integrity of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Journal of Fish Diseases*, 32:755-766.

Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Bøgwald J, Castex M, Ringø E (2010). The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. *Aquaculture*, 302:1–18.

Merrifield DL, Bradley G, Harper GM, Baker RTM, Munn CB, Davies SJ (2011a). Assessment of the effects of vegetative and lyophilized *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilization, intestinal colonization and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture Nutrition*, 17:73-79.

Merrifield DL, Olsen RE, Myklebust R, Ringø E (2011b). Dietary effect of soybean (*Glycine max*) products on gut histology and microbiota of fish. *Soybean and Nutrition*, ed. H. El-Shemy. InTech, Rijeka, Croatia, 231-250.

Merrifield DL, Harper GM, Mustafa S, Carnevali O, Picchietti S, Davies SJ (2011c). Effect of dietary alginic acid on juvenile tilapia (*Oreochromis niloticus*) intestinal microbial balance, intestinal histology and growth performance. *Cell and Tissue Research*, 344:135-146.

Merrifield DL, Shaw BJ, Harper GM, Saoud IP, Davies SJ, Handy RD, Henry TB (2013). Ingestion of metal-nanoparticle contaminated food disrupts endogenous microbiota in zebrafish (*Danio rerio*). *Environmental Pollution*, 174:157-163.

Millanao BA, Barrientos HM, Gomez CC, Tomova A, Buschmann A, Dölz H, Cabello FC (2011). Injudicious and excessive use of antibiotics: public health and salmon aquaculture in Chile. *Revista médica de Chile*, 139:107-118.

Mohapatra S, Chakraborty T, Prusty AK, Das P, Paniprasad K, Mohanta KN (2012). Use of different microbial probiotics in the diet of rohu, *Labeo rohita* fingerlings: effects on growth, nutrient digestibility and retention, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *Aquaculture Nutrition*, 18:1-11.

Mohapatra S, Chakraborty T, Kumar V, Deboeck G, Mohanta KN (2013). Aquaculture and stress management: a review of probiotic intervention. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97:405-430.

Montero D, Benitez-Dorta V, Caballero MJ, Ponce M, Torrecillas S, Izquierdo M, Manchado M (2015). Dietary vegetable oils: Effects on the expression of immune-related genes in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) intestine. *Fish and Shellfish Immunology*, 44:100-108.

Montes M, Farto R, Pérez MJ, Armada SP, Nieto TP (2006). Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. *Research in Microbiology*, 157:487-495.

Morais S, Koveb W, Ronnestad I, Dinis MT, Conceicao LEC (2005a). Dietary protein/lipid ratio affects growth and amino acid and fatty acid absorption and metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture*, 246:347-357.

Morais S, Koven W, Rønnestad I, Dinis MT, Conceicao LEC (2005b). Dietary protein:lipid ratio and lipid nature affects fatty acid absorption and metabolism in a teleost larva. *British Journal of Nutrition*, 93:813-820.

Morais S, Aragão C, Cabrita E, Conceição LEC, Constenla M, Costas B, Dias J, Duncan N, Engrola S, Estevez A, Gisbert E, Mañanós E, Valente LMP, Yúfera M, Dinis MT (2014). New developments and biological insights into the farming of *Solea senegalensis* reinforcing its aquaculture potential. *Reviews in Aquaculture*, 6:1-31.

Mrakovcic-Sutic I, Jakovac H, Simin M, Grebic D, Cuk M, Trobonjaca Z, Radosevic-Stasic B (2008). Heat shock protein-GP96 as an innate sensor of damage and activator of autoreactive NKT and regulatory T cells during liver regeneration. *Histopathology and Histochemistry*. <http://hdl.handle.net/10201/29831>

Mulder IE, Wadsworth S, Secombes CJ (2007). Cytokine expression in the intestine of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) during infection with *Aeromonas salmonicida*. *Fish and Shellfish Immunology*, 23:747-759.

Multhoff G (2006). Heat shock proteins in immunity. In *Molecular Chaperones in Health and Disease* (Ed. Springer Berlin Heidelberg) 9:279-304.

Mountfort DO, Campbell J, Clements KD (2002). Hindgut fermentation in three species of marine herbivorous fish. *Applied and Environmental Microbiology*, 68:1374-1380.

Mouzaki M, Comelli EM, Arendt BM, Bonengel J, Fung SK, Fischer SE, McGilvray I, Allard JP (2013). Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver disease. *Hepatology*, 58:120-127.

Mowry RW (1963). The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. Whit revised directions for the colloidal iron stain, the use of alcian blue G8X and their combinations with the periodic acid-schiff reaction. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 106:402-423.

Muñoz-Atienza E, Landeta G, de las Rivas B, Gómez-Sala B, Muñoz R, Hernández PE, Cintas LM, Herranz C (2011). Phenotypic and genetic evaluations of biogenic amine production by lactic acid bacteria isolated from fish and fish products. *International Journal of Food Microbiology*, 146:212-216.

Muñoz-Atienza E, Gómez-Sala B, Araújo C, Campanero C, Del Campo R, Hernández PE, Herranz C, Cintas LM (2013). Antimicrobial activity, antibiotic susceptibility and virulence factors of Lactic Acid Bacteria of aquatic origin intended for use as probiotics in aquaculture. *BMC microbiology*, 13:15.

Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993). Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Applied Environmental Microbiology*, 59:695-700.

Muyzer G y Smalla K (1998). Application of denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) and temperature gradient gel electrophoresis (TGGE) in microbial ecology. *Antonie Van Leeuwenhoek International Journal of Genetic Molecular and Microbiology*, 73:127-141.

Naka H, Liu M, Crosa JH (2013). Two ABC transporter systems participate in siderophore transport in the marine pathogen *Vibrio anguillarum* 775 (pJM1). FEMS Microbiology Letters, 34:79-86.

Naka H y Crosa JH (2011). Genetic determinants of virulence in the marine fish pathogen *Vibrio anguillarum*. Fish pathology, 46:1-10.

Navarrete P, Espejo RT, Romero J (2009). Molecular analysis of microbiota along the digestive tract of juvenile Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Microbial Ecology, 57:550-561.

Navarrete P, Toledo I, Mardones P, Opazo R, Espejo R, Romero J (2010). Effect of *Thymus vulgaris* essential oil on intestinal bacterial microbiota of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum) and bacterial isolates. Aquaculture Research, 41:667-678.

Navarrete P, Fuentes P, la Fuente L, Barros L, Magne F, Opazo R, Ibacache C, Espejo R y Romero J (2013). Short-term effects of dietary soybean meal and lactic acid bacteria on the intestinal morphology and microbiota of Atlantic salmon (*Salmo salar*). Aquaculture Nutrition, 19:827-836.

Nayak SK, Swain P, Mukherjee SC (2007). Effect of dietary supplementation of probiotic and vitamin C on the immune response of Indian major carp, *Labeo rohita* (Ham.). Fish and Shellfish Immunology, 23:892-896.

Nayak SK (2010). Role of gastrointestinal microbiota in fish. Aquaculture Research, 41:1553-1573.

Newaj-Fyzul A, Adesiyunz AA, Mutani A, Ramsabhag A, Brunt J, Austin B (2007) *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). Journal of Applied Microbiology, 103:1699-1706.

Newaj-Fyzul A, Al-Harbi AH, Austin B (2014). Review: developments in the use of probiotics for disease control in aquaculture. Aquaculture, 431:1-11.

Ngamkala S, Futami K, Endo M, Maita M, Katagir T (2010). Immunological effects of glucan and *Lactobacillus rhamnosus* GG, a probiotic bacterium, on Nile tilapia *Oreochromis niloticus* intestine with oral *Aeromonas* challenges. Aquaculture, 76:833-840.

Ngan PTT y Phu TQ (2011). Effects of *Bacillus* bacteria (B8, B37, B38) on water quality of black tiger shrimp (*Penaeus monodon*) cultured tanks. Proceedings of the 4th Aquaculture and Fisheries Conference.

Nikoskelainen S, Ouwehand AC, Bylund G, Salminen S, Lilius E (2003). Immune enhancement in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by potential probiotic bacteria (*Lactobacillus rhamnosus*). Fish and Shellfish Immunology, 15:443-52.

Nimrat S, Suksawat T, Boonthai V, Vuthiphandchai (2012). Potential *Bacillus* probiotics enhance bacterial numbers, water quality and growth during early development of white shrimp (*Litopenaeus vannamei*). Veterinary Microbiology, 159:443-450.

Noga EJ, Ullal AJ, Corrales J, Fernandes JM (2011). Application of antimicrobial polypeptide host defenses to aquaculture: Exploitation of downregulation and upregulation res-

ponses. Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics, 6:44-54.

Norambuena F, Mackenzie S, Bell JG, Callol A, Estévez A, Duncan N (2012a). Prostaglandin (F and E, 2-and-3 series) production and cyclooxygenase (COX-2) gene expression of wild and cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). General and comparative Endocrinology, 177:256-262.

Norambuena F, Estevez A, Bell G, Carazo I, Duncan N (2012b). Proximate and fatty acid compositions in muscle, liver and gonads of wild versus cultured broodstock of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), Aquaculture 356:176-185.

Norambuena F, Morais S, Estévez A, Bell JG, Tocher DR, Navarro JG (2013a). Dietary modulation of arachidonic acid metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) broodstock reared in captivity. Aquaculture, 372:80-88.

Norambuena F, Estévez A, Mañanós E, Bell JG, Carazo I, Duncan N (2013b). Effects of graded levels of arachidonic acid on the reproductive physiology of Senegalese sole (*Solea senegalensis*): fatty acid composition, prostaglandins and steroid levels in the blood of broodstock bred in captivity. General and Comparative Endocrinology, 191:92-101.

Norman K y Pirlich M (2008). Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick?. Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolic Care, 11:613-619.

Northey A, Denis D, Cirino M, Metters KM, Nantel F (2000). Cellular distribution of prostanoid EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. Prostaglandins and Other Lipid Mediators, 62:145-156.

Oke AO, Olaoye OJ, Nnali KE (2013). Recent advances in fish diseases treatment: probiotics as alternative therapy to antibiotics in aquaculture "A review". Advances in Agriculture, Sciences and Engineering Research, 3:668-676.

Olafsen JA (2001). Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. Aquaculture, 200:223-247.

Oliva M, Vicente JJ, Gravato C, Guilhermino L, Galindo-Riaño MD (2012). Oxidative stress biomarkers in Senegal sole, *Solea senegalensis*, to assess the impact of heavy metal pollution in a Huelva estuary (SW Spain): seasonal and spatial variation. Ecotoxicology and Environmental Safety, 75:151-162.

Olsen RE, Myklebust R, Kaino T, Ringo E (1999). Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. Fish Physiology and Biochemistry, 21:35-44.

Olsen RE, Myklebust R, Ringø E, Mayhew TM (2000). The influence of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. Fish Physiology Biochemistry, 22:207-216.

Olsen RE, Sundell L, Hansen T, Hemre GI, Myklebust R, Mayhew TM, Ringo E (2003). Acute stress damages intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. an electron microscopical study. Fish Physiology and Biochemistry, 26:211-211.

Olsen RE, Sundell K, Mayhew TM, Myklebust R, Ringo E (2005). Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), Aquaculture, 250:480-495.

Olsvik PA, Heier LS, Rosseland BO, Teien HC, Salbu B (2010). Effects of combined γ -irradiation and metal (Al+ Cd) exposures in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). Journal of Environmental Radioactivity, 101:230-236.

Olveira JG, Soares F, Engrola S, Dopazo CP, Bandín I (2008). Antemortem versus postmortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Journal of Veterinary Diagnostic Investigation, 20:215-219.

Osuna-Jiménez I, Williams TD, Prieto-Álamo MJ, Abril N, Chipman JK, Pueyo C (2009). Immune-and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. Fish and Shellfish Immunology, 26:699-706.

Padmavathi P, Sunitha K, Veeraiah K (2012). Efficacy of probiotics in improving water quality and bacterial flora in fish ponds. African Journal of Microbiology Research, 6:7471-7478.

Paik YH y Brenner DA (2011). NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis. The Korean Journal of Hepatology, 17:251-257.

Palaksha KJ, Shin GW, Kim YR, Jung TS (2008). Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). Fish and Shellfish Immunology, 24:479-488.

Palermo FA, Mosconi G, Avella MA, Carnevali O, Verdenelli MC, Cecchini C, Polzonetti-Magni AM (2011). Modulation of cortisol levels, endocannabinoid receptor 1A, proopiomelanocortin and thyroid hormone receptor alpha mRNA expressions by probiotics during sole (*Solea solea*) larval development. General and Comparative Endocrinology, 171:293-300.

Palermo FA, Cardinaletti G, Cocci P, Tibaldi E, Polzonetti-Magni A, Mosconi G (2013). Effects of dietary nucleotides on acute stress response and cannabinoid receptor 1 mRNAs in sole, *Solea solea*. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 164:477-482.

Pandiyani P, Balaraman D, Thirunavukkarasu R, George EGJ, Subaramaniyan K, Manikkam S, Sadayappan B (2013). Probiotics in aquaculture. Drug Invention Today, 5:55-59.

Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J, Kobayashi T, Satoh S, Sugita H (2005). The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture, 243:241-254

Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirano I, Kobayashi T, Sugita H, Puangkaew J, Aoki T (2007a). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. Development Comparative Immunology, 31:372-382.

Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Hirono I, Kobayashi T, Sugita H y col., (2007b). Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Developmental and Comparative Immunology*, 31:372-382.

Panigrahi A, Kiron V, Satoh S, Watanabe T (2010). Probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus* influences the blood profile in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Fish physiology and Biochemistry*, 36:969-977.

Panigrahi A, Viswanath K, Satoh S (2011). Real-time quantification of the immune gene expression in rainbow trout fed different forms of probiotic bacteria *Lactobacillus rhamnosus*. *Aquaculture Research*, 42:906-917.

Pankhurst NW y Van Der Kraak G (2000). Evidence that acute stress inhibits ovarian steroidogenesis in rainbow trout in vivo, through the action of cortisol. *General and Comparative Endocrinology*, 117:225-237.

Parra G y Yúfera M (2001). Comparative energetics during early development of two marine fish species, *Solea senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.). *Journal of Experimental Biology*, 204:2175-2183.

Parra G y Yúfera M (2002). Tolerance response to water pH in larvae of two marine fish species, gilthead seabream, *Sparus aurata* (L.) and Senegal sole, *Solea senegalensis* (Kaup), during development. *Aquaculture Research*, 33:747-752.

Pascual J, Macián MC, Arahal DR, Garay E, Pujalte MJ (2010). Multilocus sequence analysis of the central clade of the genus *Vibrio* by using the 16S rRNA, recA, pyrH, rpoD, gyrB, rctB and toxR genes. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 60:154-165.

Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, Shouche YS, Chincholkar SB (2010). Evaluation of probiotic characteristics of siderophoregenic *Bacillus* spp. isolated from dairy waste. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 160:140-155.

Pereiro P, Figueras A, Novoa B (2012). A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload. *Fish and Shellfish Immunology*, 32:879-889.

Pérez JL, Balcázar I, Ruiz-Zarzuela N, Halaihel D, Vendrell I, de Blas JL, Múzquiz (2010). Host-interactions within the fish intestinal ecosystem. *Mucosal Immunology*, 3:355-360.

Pérez-Sánchez T, Balcázar JL, Merrifield DL, Carnevali O, Gioacchini G, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I (2011). Expression of immune-related genes in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) induced by probiotic bacteria during *Lactococcus garvieae* infection. *Fish and Shellfish Immunology*, 31:196-201.

Pfaffl MW (2001). A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. *Nucleic Acids Research*, 29:45.

Pfaffl MW, Tichopad A, Prgomet C, Neuvians TP (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology Letters*, 26:509-515.

Pickering AD y Pottinger TG (1989). Stress responses and disease resistance in salmonid fish: effects of chronic elevation of plasma cortisol. *Fish Physiology and Biochemistry*, 7:253-258.

Pickering AD, Pottinger TG, Sumpter JP, Carragher JF, Le Bail PY (1991). Effects of acute and chronic stress on the levels of circulating growth hormone in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *General and Comparative Endocrinology*, 83:86-93.

Pinto W, Aragão C, Soares F, Dinis MT, Conceição LEC (2007). Growth, stress response and free amino acid levels in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858) chronically exposed to exogenous ammonia. *Aquaculture Research*, 38:1198-1204.

Pinto W, Figueira L, Ribeiro L, Yúfera M, Dinis MT, Aragão C (2010). Dietary taurine supplementation enhances metamorphosis and growth potential of *Solea senegalensis* larvae. *Aquaculture*, 309:159-164.

Pinto W, Rønnestad I, Jordal AEO, Gomes AS, Dinis MT, Aragão C (2012). Cloning, tissue and ontogenetic expression of the taurine transporter in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aminoacids*, 42:1317-1327.

Piñeiro-Vidal M, Centeno-Sestelo G, Riaza A, Santos Y (2007). Isolation of pathogenic *Tenacibaculum maritimum*-related organisms from diseased turbot and sole cultured in the Northwest of Spain. *Bulletin-European Association of Fish Pathologists*, 27:29-35.

Piñeiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008a). *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallaicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:21-25.

Piñeiro-Vidal M, Carballas CG, Gómez-Barreiro O, Riaza A, Santos Y (2008b). *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58:881-885.

Pirarat N, Pinpimai K, Endo M, Katagiri T, Ponpornpisit A, Chansue N, Maita M (2011). Modulation of intestinal morphology and immunity in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) by *Lactobacillus rhamnosus*. *Research in Veterinary Science*, 91:92-97.

Plant K P, Scott E, LaPatra (2011). Advances in fish vaccine delivery. *Developmental & Comparative Immunology*, 35:1256-1262.

Pohlenz C y Gatlin DM (2014). Interrelationships between fish nutrition and health. *Aquaculture*, 431:111-117.

Ponce M, Salas-Leiton E, Garcia-Cegarra A, Boglino A, Coste O, Infante C, Gisbert E, Rebordinos L, Manchado M. (2011). Genomic characterization, phylogeny and gene regu-

lation of g-type lysozyme in sole (*Solea senegalensis*). Fish and Shellfish Immunology, 31:925-937.

Pooramini M, Kamali A, Hajimoradloo A, Alizadeh M, Ghorbani R (2009). Effect of using yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) as probiotic on growth parameters, survival and carcass quality in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* fry. International Aquatic Research, 1:39-44.

Prescott JFJD y Baggot (1993). Terapéutica antimicrobiana veterinaria. 2ª ed. Acribia S.A., Zaragoza (España).

Press CML y Evensen Ø (1999). The morphology of the immune system in teleost fishes. Fish and Shellfish Immunology, 9:309-318.

Prieto-Álamo MJ, Cabrera-Luque J, Pueyo C (2003). Absolute quantitation of normal and ROS-induced patterns of gene expression: an in vivo real-time PCR study in mice. Gene Expression, 11:23-34.

Prieto-Álamo MJ, Abril N, Osuna-Jiménez I, Pueyo C (2009). *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: Large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time RT-PCR. Aquatic Toxicology, 91:312-319.

Pujalte MJ, Sitja-Bobadilla A, Macián MC, Belloch C, Alvarez-Pellitero P, Perez-Sanchez J, Garay E (2003). Virulence and molecular typing of *Vibrio harveyi* strains isolated from cultured dentex, gilthead sea bream and european sea bass. Systematic and Applied Microbiology, 26:284-292.

Qiao G, Lee DC, Woo SH, Li H, Xu DH, Park SI (2012). Microbiological characteristics of *Vibrio scopthalmi* isolates from diseased olive flounder *Paralichthys olivaceus*. Fisheries Science, 78:853-863.

Qiao Y, Sun J, Ding Y, Le G, Shi Y (2013). Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress. Applied Microbiology and Biotechnology, 97:1689-1697.

Quesada SP, Paschoal JAR, Reyes FGR (2013). Considerations on the Aquaculture Development and on the Use of Veterinary Drugs: Special Issue for Fluoroquinolones—A Review. Journal of Food Science, 78:R1321-R1333.

Ragap HM, Khalil RH, Mutawie HH (2012). Immunostimulant effects of dietary *Spirulina platensis* on tilapia *Oreochromis niloticus*. Journal of Applied Pharmaceutical Science, 02:26-31.

Rajanbabu V, Pan CY, Lee SC, Lin WJ, Lin CC, Li CL, Chen JY (2010). Tilapia hepcidin 2-3 peptide modulates lipopolysaccharide-induced cytokines and inhibits Tumor Necrosis Factor- α through cyclooxygenase-2 and phosphodiesterase 4D. Journal of Biological Chemistry, 285:30577-30586.

Ramírez-Santana C, Castellote C, Castell M, Rivero M, Rodríguez-Palmero M, Franch À, Pérez-Cano FJ (2009). Long-term feeding of the cis-9, trans-11 isomer of conjugated lino-

leic acid reinforces the specific immune response in rats. *The Journal of Nutrition*, 139:76-81.

Ramos MA, Weber B, Gonçalves JF, Santos GA, Rema P, Ozório RO (2013). Dietary probiotic supplementation modulated gut microbiota and improved growth of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular and Integrative Physiology*, 166:302-307.

Rasines I, Gómez M, Martín I, Rodríguez C, Mañanós E, Chereguini O (2013). Artificial fertilisation of cultured Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Effects of the time of day of hormonal treatment on inducing ovulation. *Aquaculture*, 392-395:94-97.

Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004). Gnotobiotic zebra-fish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA*, 101:4596-4601.

Ray AK, Ghosh K, Ringø E (2012). Enzyme-producing bacteria isolated from fish gut: a review. *Aquaculture Nutrition*, 18:465-492.

Rengpipat S (2005). Probiotic bacteria: are they beneficial. In *Proceedings of the 5th symposium on diseases in Asian aquaculture*. Asian Fisheries Society.

Rengpipat S, Rueangruklikhit T, Piyatiratitivorakul S (2008). Evaluations of lactic acid bacteria as probiotics for juvenile seabass *Lates calcarifer*. *Aquaculture Research*, 39:134-143.

Reverter M, Bontemps N, Lecchini D, Banaigs B, Sasal P (2014). Use of plant extracts in fish aquaculture as an alternative to chemotherapy: current status and future perspectives. *Aquaculture*, 433:50-61.

Rico RM, Tapia-Paniagua S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2008). Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Journal of Applied Microbiology*, 105:752-760.

Ringø E, Sinclair PD, H Birkbeck, Barbour A (1992a). Production of eicosapentaenoic acid (20: 5 n-3) by *Vibrio pelagius* isolated from turbot (*Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Applied and Environmental Microbiology*, 58:3777-3778.

Ringø E, Jøstensen JP, Olsen RE (1992b). Production of eicosapentaenoic acid by freshwater *Vibrio*. *Lipids*, 27:564-566.

Ringø E, Birkbeck TH, Munro PD, Vadstein O, Hjelmeland K, (1996). The effect of early exposure to *Vibrio pelagius* on the aerobic bacterial flora of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.) larvae. *Journal of Applied Bacteriology*, 81:207-11.

Ringø E, Bendiksen HR, Gausen SJ, Sundsfjord A, Olsen RE (1998). The effect of dietary fatty acids on lactic acid bacteria associated with the epithelial mucosa and from faecalia of Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Journal of Applied Microbiology*, 85:855-864.

Ringø E y Birkbeck TH (1999). Intestinal microflora of fish larvae and fry. *Aquaculture Research*, 30:73-93.

Ringø E y RE Olsen (1999). The effect of diet on aerobic bacterial flora associated with intestine of Arctic charr (*Salvelinus alpinus* L.). *Journal of Applied Microbiology*, 86:22-28.

Ringø, E, Olsen RE, Mayhew TM, Myklebust R (2003). Electron microscopy of the intestinal microflora of fish. *Aquaculture*, 227:395-415.

Ringø E, Jutfelt F, Kanapathipillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE (2004). Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell and Tissue Research*, 318:305-311.

Ringø E, Sperstad S, Myklebust R, Refstie S, Krogdahl A (2006). Characterisation of the microbiota associated with intestine of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) The effect of fish meal, standard soybean meal and a bioprocessed soybean meal. *Aquaculture*, 261:829-841.

Ringø E, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE (2007). Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture*, 268:251-264.

Ringø E (2008). The ability of carnobacteria isolated from fish intestine to inhibit growth of fish pathogenic bacteria: a screening study. *Aquaculture Research*, 39:171-180.

Ringø E, Lovmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R, Olsen RE, Mayhew TM, (2010). Lactic acid bacteria *vs* pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquaculture Research*, 41:451-467.

Ritchie JM, Rui H, Zhou X, Iida T, Kodoma T, Ito S, Davis BM, Bronson RT, MK Waldor (2012). Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *PLoS Pathogens*, 8:1002593-1002593.

Rivera-Posada JA, Pratchett M, Cano-Gómez A, Arango-Gómez JD, Owens L (2011). Refined identification of *Vibrio* bacterial flora from *Acanthaster planci* based on biochemical profiling and analysis of housekeeping genes. *Diseases of Aquatic Organisms*, 96:113-123.

Rodiles A, Santigosa E, Herrera M, Hachero-Cruzado I, Cordero ML, Martínez-Llorens S, Lall S, Alarcón FJ (2012). Effect of dietary protein level and source on digestive proteolytic enzyme activity in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis* Kaup 1850. *Aquaculture International*, 20:1053-1070.

Rodríguez S, Vilas MP, Gutiérrez MC, Pérez-Prieto SI, Sarasquete MC, Rodríguez RB (1997). Isolation and preliminary characterization of a Birnavirus from the sole *Solea Senegalensis* in Southwest Spain. *Journal of Aquatic Animal Health*, 9:295-300.

Roeselers G, Mittge EK, Stephens WZ, Parichy DM, Cavanaugh CM, Guillemin K, Rawls JF (2011). Evidence for a core gut microbiota in the zebrafish. *The ISME journal*, 5:1595-1608.

Rogstad A, Hormazabal V, Ellingsen OF, Rasmussen KE (1991). Pharmacokinetic study of oxytetracycline in fish. I. Absorption, distribution and accumulation in rainbow trout in freshwater. *Aquaculture*, 96:219-226.

Romalde JL (2002). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated view of a bacterial fish pathogen. *International Microbiology*, 5:3-9.

Romalde JL, Ravelo C, López-Romalde S, Avendaño R, Magariños B, Toranzo AE (2005). Vaccination strategies to prevent important emergin diseases for Spanish aquaculture. Midtlyng, P.J. (ed), *Fish vaccinology. Developments in Biologicals*, 121:85–95.

Román L, Real F, Sorroza L, Padilla D, Acosta B, Grasso V, Acosta F (2012). The *in vitro* effect of probiotic *Vagococcus fluvialis* on the innate immune parameters of *Sparus aurata* and *Dicentrarchus labrax*. *Fish and Shellfish Immunology*, 33:1071-1075.

Román L, Real F, Padilla D, El Aamri F, Déniz S, Grasso V, Acosta F (2013). Cytokine expression in head-kidney leucocytes of European sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) after incubation with the probiotic *Vagococcus fluvialis* L-21. *Fish and Shellfish Immunology*, 35,1329-1332.

Romarheim OH, Landsverk T, Mydland LT, Skrede A, Øverland M (2013). Cell wall fractions from *Methylococcus capsulatus* prevent soybean meal-induced enteritis in Atlantic salmon (*Salmo salar*). *Aquaculture*, 402:13-18.

Roy T, Mondal S, Ray AK (2009). Phytase-producing bacteria in the digestive tracts of some freshwater fish. *Aquaculture Research*, 40:344-353.

Rueda-Jasso R, Conceição LE, Dias J, De Coen W, Gomes E, Rees JF, Soares F, Dinis MT, Sorgeloos P (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Aquaculture*, 231:417-433.

Russell NJ y Nichols DS (1999). Polyunsaturated fatty acids in marine bacteria-a dogma rewritten. *Microbiology*, 145:767-779.

Ruwandepika HAD, Defoirdt T, Bhowmick PP, Shekar M, Bossier P, Karunasagar I (2010). Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the Harvey clade. *Journal of Applied Microbiology*, 109:888–899.

Sáenz de Rodríguez M, Alarcón FJ, Martínez MI, Ruiz F, Díaz M, Moyano FJ (2005). Caracterización de las proteasas digestivas del lenguado senegalés *Solea senegalensis* Kaup, 1858. *Boletín Instituto Español de Oceanografía*, 21:95-104.

Sáenz de Rodríguez MA, Díaz-Rosales P, Chabrilón M, Smidt H, Arijó S, León-Rubio JM, Alarcón FJ, Balebona MC, Moriño MA, Cara JB, Moyano FJ (2009). Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquaculture Nutrition*, 15:177–185.

Sáenz de Rodríguez M, de Oña C, Alarcón FJ, Martínez MI, Díaz M, Moyano FJ (2011). Crecimiento y enzimas digestivas de larvas de *Solea senegalensis* Kaup, 1858 alimentadas con piensos comerciales. *Boletín. Instituto Español de Oceanografía*, 21:105-113.

Sakai M (1999). Current research status of fish immunostimulants. *Aquaculture*, 172:63-92

Salas-Leiton E, Anguis V, Manchado M, Canavate JP (2008). Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture*, 285: 84-89.

Salas-Leiton E, Anguis V, Martín-Antonio B, Crespo D, Planas JV, Infante C, Cañavate JP, Manchado M (2010). Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): Potential effects on the immune response. *Fish and Shellfish Immunology*, 28:296-302.

Salas-Leiton E, Coste O, Asensio E, Infante C, Cañavate JP, Manchado M (2012a). Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). *Fish and Shellfish Immunology*, 32:769-778.

Salas Leitón E, Rodríguez-Rúa A, Asensio E, Infante C, Manchado M, Fernández-Díaz C, Cañavate JP (2012b). Effect of salinity on egg hatching, yolk sac absorption and larval rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). *Reviews in Aquaculture*, 4:49-58.

Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A, Meseguer J, Chabrillón M, Moriñigo MA, Esteban MA (2006). Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 111:279-286.

Salinas I, Abelli L, Bertoni F, Picchietti S, Roque A, Furones D, MA (2008). Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish and Shellfish Immunology*, 25:114-123.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). *Molecular cloning*, 1989. *Journal of Biological Chemistry*, 264.

Sanders ME (2008). Probiotics: definition, sources, selection, and uses. *Clinical Infectious Diseases*, 46: S58-S61.

Sandoval-Castilla O, Lobato-Calleros C, García-Galindo HS, Alvarez-Ramírez J, Vernon-Carter EJ (2010). Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *Food Research International*, 43:111-117.

Sanguinetti CJ, Dias NE, Simpson AJ (1994). Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques*, 17:914-921.

Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL (2007). Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *Journal of Bacteriology*, 189:7932-6.

Schreiter K, Hausmann M, Spoettl T, Strauch TS, Bataille F, Schoelmerich J, Herfarth H, Falk W, Rogler G (2005). Glycoprotein (gp) 96 expression: induced during differentiation of intestinal macrophages but impaired in Crohn's disease. *Gut*, 54:935-943.

Scopa CD, Koureleas S, Tsamandas AC, Spiliopoulou I, Alexandrides T, Filos KS, Vagianos CE (2010). Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats. *Journal of the American College of Surgeons*, 190:423–431.

Sears CL (2005). A dynamic partnership: Celebrating our gut flora. *Anaerobe*, 11:247–251.

Secombes CJ (2011). Fish immunity: the potential impact on vaccine development and performance. *Aquaculture Research*, 42:90-92.

Seeto SG, Veivers PC, Clements KD, Slaytor M (1996). Carbohydrate utilization by microbial symbionts in the marine herbivorous fishes *Odax cyanomelas* and *Crinodus lophodon*. *Journal of Comparative Physiology B*, 165:571-579.

Semyonov D, Ramon O, Kaplun Z, Levin-Brener L, Gurevich N, Shimoni E (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43:193-202.

Semova I, Carten JD, Stombaugh J, Mackey LC, Knight R, Farber SA, Rawls JF (2012). Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe* 12: 277–288.

Serezli R, Cagiran H, Okumus I, Akhan S, Balta F (2005). The effect of oxytetracycline on non-specific immune response in sea bream (*Sparus aurata* L. 1758). *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 29:31-35.

Shakibazadeh S, Che Roos S, Hafezieh M, Christianus A, Saleh Kamarudin M, Kamaruzaman S (2012). A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaes monodon*. *Iranian Journal of Fisheries Sciences*, 11:849-866.

Shannon CE y Weaver W (1949). *The Mathematical Theory of Communication*. University of Illinois.

Sharifuzzaman SM y Austin B, (2010). *Kocuria* SM1 controls vibriosis in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). *Journal of Applied Microbiology*, 108:2162-2170.

Sharifuzzaman SM, Abbass A, Tinsley JW, Austin B (2011). Subcellular components of probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2 induce protective immunity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) against *Vibrio anguillarum*. *Fish and Shellfish Immunology*, 30:347-353.

Sharifuzzaman SM, Al-Harbi AH, Austin B (2014). Characteristics of growth, digestive system functionality, and stress factors of rainbow trout fed probiotics *Kocuria* SM1 and *Rhodococcus* SM2. *Aquaculture*, 418:55-61.

Sherman PM, Ossa JC, Johnson-Henry K (2009). Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutrition in Clinical Practice*, 24:10-14.

Shi FD y Van Kaer L (2006). Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells. *Nature Review Immunology*, 6:751-760.

Sica MG, Brugnoli LI, Marucci PL, Cubitto MA (2012). Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from an estuarine environment for application in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) farming. *Antonie van Leeuwenhoek*, 101:869-879.

Silva JM, Espe M, Conceição LE, Dias J, Costas B, Valente LM (2010). Feed intake and growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858) fed diets with partial replacement of fish meal with plant proteins. *Aquaculture Research*, 41:20-30.

Silva JMG, Valente LMP, Castro-Cunha M, Bacelar M, Guedes de Pinho P (2012). Impact of dietary plant protein levels on the volatile composition of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) muscle. *Food Chemistry*, 131:596-602.

Silver N, Best S, Jiang J, Thein SL (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC Molecular Biology*, 7:33.

Simonart T, Boelaert JR, Mosselmans R, Andrei G, Noel JC, De Clercq E, Snoeck R (2002). Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells. *Gynecologic Oncology*, 85:95-102.

Sire MF, Lutton C, Vernier JM (1981). New views on intestinal absorption of lipids in teleostean fishes: an ultrastructural and biochemical study in the rainbow trout. *Journal of Lipid Research*, 22:81-94.

Siscar R, Torreblanca A, Del Ramo J, Solé M (2014). Modulation of metallothionein and metal partitioning in liver and kidney of *Solea senegalensis* after long-term acclimation to two environmental temperatures. *Environmental Research*, 132:197-205.

Skirpstunas RT y Baldwin TJ (2002). *Edwardsiella ictaluri* invasion of IEC-6, Henle 407, fathead minnow and channel catfish enteric epithelial cells. *Diseases of Aquatic Organisms*, 51:161-167.

Skjermo J, Bakke I, Dahle SW, Vadstein O (2015). Probiotic strains introduced through live feed and rearing water have low colonizing success in developing Atlantic cod larvae. *Aquaculture*, 438: 17-23.

Skrodenyte-Arbaciauskiene V, Sruoga A, Butkauskas D, Skrupskelis K (2008). Phylogenetic analysis of intestinal bacteria of freshwater salmon *Salmo salar* and sea trout *Salmo trutta* and diet. *Fisheries Science*, 74:307-314.

Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z (2005). Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotics and antibiotic growth promoter supplementation. *Journal of Nutrition*, 135:187-92.

Smith P y Samuelson OB (1996). Estimates of the significance of out-washing of oxytetracycline from sediments under Atlantic salmon sea-cages. *Aquaculture*, 144:17-26.

Smith PJ, McVeagh SM, Steinke D (2008). DNA barcoding for the identification of smoked fish products. *Journal of Fish Biology*, 72:464-471.

Smith CC, Snowberg LK, Caporaso JG, Knight R, Bolnick DI (2015). Dietary input of microbes and host genetic variation shape among-population differences in stickleback gut microbiota. The ISME journal, DOI: doi:10.1038/ismej.2015.64.

Snoussi M, Noumi E, Hajlaoui H, Usai D, Sechi LA, Zanetti S, Bakhrouf A (2009). High potential of adhesion to abiotic and biotic materials in fish aquaculture facility by *Vibrio alginolyticus* strains. Journal of Applied Microbiology, 106:1591-1599.

Soares F, Dinis MT, Sorgeloos P (2004). Effect of dietary non-protein energy levels on condition and oxidative status of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. Aquaculture, 231:417-433.

Somerset CR y Saillant EA (2014). Regional population structure and management of aquaculture for stock enhancement of the spotted seatrout (*Cynoscion nebulosus*). Aquaculture, 433:66-73.

Son VM, Chang CC, Wu MC, Guu YK, Chiu CH, Cheng W (2009). Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, 26:691-698.

Song Y, Salbu B, Heier LS, Teien HC, Lind OC, Oughto D, Petersen K, Rosseland BO, Skipperud L, Tollefsen KE (2012). Early stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium. Aquatic Toxicology, 112:62-71.

Sonnenburg ED y Sonnenburg JL (2014). Starving our microbial self: the deleterious consequences of a diet deficient in microbiota-accessible carbohydrates. Cell Metabolism, 20: 779-786.

Sorroza L, Padilla D, Acosta F, Román L, Grasso V, Vega J, Real F (2012). Characterization of the probiotic strain *Vagococcus fluvialis* in the protection of European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) against vibriosis by *Vibrio anguillarum*. Veterinary Microbiology, 155:369-373.

Sorroza L, Real F, Acosta F, Acosta B, Deniz S, Roman L, El Aamri F, Padilla D (2013). A Probiotic Potential of *Enterococcus gallinarum* against *Vibrio anguillarum* Infection. Fish Pathology, 48:9-12.

Soto-Rodriguez SA, Gómez-Gil B, Lozano R, del Río-Rodríguez R, Dieguez AL, Romalde JL (2012). Virulence of *Vibrio harveyi* responsible for the "Bright-red" syndrome in the Pacific White shrimp *Litopenaeus vannamei*. Journal of Invertebrate Pathology, 109:307-317.

Souto S, Oliveira JG, Bandín I (2015). Influence of temperature on Betanodavirus infection in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). Veterinary microbiology, 179:162-167.

Spisni E, Tugnoli M, Ponticelli A, Mordenti T, Tomasi V (1998). Hepatic steatosis in artificially fed marine teleosts. Journal of Fish Diseases, 21:177-184.

Standen BT, Rawling MD, Davies SJ, Castex M, Foey A, Gioacchini G, Carnevali O, Merrifield DL (2013). Probiotic *Pediococcus acidilactici* modulates both localised intestinal- and peripheral-immunity in tilapia (*Oreochromis niloticus*). Fish and Shellfish Immunology, 35:1097-1104.

Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, Wong S, Rawls JF, Guillemin K, Bohannan BJ (2015). The composition of the zebrafish intestinal microbial community varies across development. The ISME journal, DOI:10.1038/ismej.2015.64

Stevens BG, Dunham A, Kittaka J, Kovatcheva N, Persselin S, vd Meeren G (2014). Aquaculture and stock enhancement of king crabs. King Crabs of the World: Biology and Fisheries Management. CRC Press (Taylor and Francis): 403-448.

Ström-Bestor M y Wiklund T (2011). Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp. on *Flavobacterium psychrophilum*, *in vitro*. Journal of Fish Diseases, 34: 255-264.

Sugita H, Mizuki H, Itoi S (2012). Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. Aquaculture Research, 43:481-488.

Sullam KE, Essinger SD, Lozupone CA, O'Connor MP, Rosen GL, Knight RO B, Russell JA (2012). Environmental and ecological factors that shape the gut bacterial communities of fish: a meta-analysis. Molecular Ecology, 21:3363-3378.

Sun Y, Peng Y, Aksornkoae N, Johnson JR., Boring JG, Scruggs D, Cooper RC, Casey-Laizure S, Shukla AJ (2002). Controlled release of oxytetracycline in sheep. Journal of Controlled Release, 85:125-134.

Sun YZ, Yang HL, Ma RL, Lin WY (2010). Probiotic applications of two dominant gut *Bacillus* strains with antagonistic activity improved the growth performance and immune responses of grouper *Epinephelus coioides*. Fish and Shellfish Immunology, 29:803-809.

Sun YZ, Yang HL, Ma RL, Huang KP, Ye JD (2012). Culture-independent characterization of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following the administration of probiotic *Enterococcus faecium*. Aquaculture International, 20:791-801.

Sun YZ, Yang HL, Huang KP, Ye JD, Zhang CX (2013) Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. Aquaculture 392:44–50.

Sung YY, Liew HJ, Bolong AMA, Wahid EA, MacRae TH (2013). The induction of Hsp70 synthesis by non-lethal heat shock confers thermotolerance and resistance to lethal ammonia stress in the common carp, *Cyprinus carpio* (Linn). Aquaculture Research, 45:1706-1712.

Suzer C, Çoban D, Kamaci HO, Saka Ş, Firat K, Otgucuoğlu Ö, Küçükşari H (2008). Lactobacillus spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. Aquaculture, 280:140-145.

Sveinsdóttir H, Steinarsson A, Gudmundsdóttir Á (2009). Differential protein expression in early Atlantic cod larvae (*Gadus morhua*) in response to treatment with probiotic bacteria. *Comparative Biochemistry and Physiology Part D: Genomics and Proteomics*, 4: 249-254.

Szabo G, Bala S, Petrasek J, Gattu A (2011). Gut Liver Axis and Sensing Microbes. *Digest Diseases*, 28:737-744.

Tafalla C, Figueras A, Novoa B (1999). Role of nitric oxide on the replication of a fish rhabdovirus, viral haemorrhagic septicaemia virus (VHSV) on macrophages. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 72:249-256.

Talpur AD, Ikhwanuddin M, Ambok Bolong AM (2013). Nutritional effects of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) on immune response of Asian sea bass, *Lates calcarifer* (Bloch) and disease resistance against *Vibrio harveyi*. *Aquaculture*, 400:46-52.

Taoka Y, Maeda H, Jo JY, Jeon MJ, Bai SC, Lee WJ, Yuge K, Koshio S (2006b) Use of live and dead probiotic cells in Tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Science*, 72:755-766.

Taverniti V, Stuknyte M, Minuzzo M, Arioli S, de Noni I, Scabiosi C, Cordova ZM, Junttila I, Hamalainen S, Turpeinen H, Mora D, Karp M, Pesu M, Guglielmetti S (2013). S-Layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Applied of Environmental Microbiology*, 79:1221-1231.

Teles M, MacKenzie S, Boltana S, Callol A, Tort L (2011). Gene expression and TNF-alpha secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide. *Fish and Shellfish Immunology*, 30:340-346.

Telli GS, Ranzani-Paiva MJT, Dias DDC, Sussel FR, Ishikawa CM, Tachibana L (2014). Dietary administration of *Bacillus subtilis* on haematology and non-specific immunity of Nile tilapia *Oreochromis niloticus* raised at different stocking densities. *Fish and Shellfish Immunology*, 39:305-11.

Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R (2008). Regulation of airway mucin gene expression. *Annual Review Physiology*, 102:1103-1116.

Tiedje JM, Asuming-Brempong S, Nüsslein K, Marsh TL, Flynn SJ (1999). Opening the black box of soil microbial diversity. *Applied Soil Ecology*, 13:109-122.

Tinh NTN, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P (2008) A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Marine Biotechnology*, 10:1-12.

Titus ERIC y Ahearn GA (1988). Short-chain fatty acid transport in the intestine of a herbivorous teleost. *Journal of Experimental Biology*, 135:77-94.

Tkavc R, Ausec L, Oren A, Gunde-Cimerman N (2011). Bacteria associated with *Artemia* spp. along the salinity gradient of the solar salterns at Eilat (Israel). *FEMS Microbiology Ecology*, 77:310-321.

Toranzo EA, Magariños B, Romalde JL (2005) A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems. *Aquaculture*, 256:37-61.

Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Ginés R, Sweetman J, Izquierdo M (2011a). Improved feed utilization, intestinal mucus production and immune parameters in sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Aquaculture Nutrition*, 17:223-233.

Torrecillas S, Makol A, Benítez-Santana T, Caballero MJ, Montero D, Sweetman J, Izquierdo M (2011b). Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish and Shellfish Immunology*, 30:674-681.

Torrecillas S, Makol A, Caballero MJ, Montero D, Dhanasiri AKS, Sweetman J, Izquierdo M (2012). Effects on mortality and stress response in European sea bass, *Dicentrarchus labrax* (L.), fed mannan oligosaccharides (MOS) after *Vibrio anguillarum* exposure. *Journal of Fish Diseases*, 35:591-602.

Torrecillas S, Makol A, Betancor MB, Montero D, Caballero MJ, Sweetman J, Izquierdo M (2013). Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish and Shellfish Immunology*, 34:1485-1495.

Tort L, Padrós F, Rotllant J, Crespo S (1998). Winter syndrome in the gilthead sea bream *Sparus aurata*. Immunological and histopathological features. *Fish and Shellfish Immunology*, 8:37-47.

Tort L (2011). Stress and immune modulation in fish. *Developmental and Comparative Immunology*, 35:1366-75.

Tovar-Ramírez D, Infante JZ, Cahu C, Gatesoupe FJ, Vázquez-Juárez R (2004). Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. *Aquaculture*, 234:415-427.

Tovar-Ramírez D, Mazurais D, Gatesoupe JF, Quazuguel P, Cahu CL, Zambonino-Infante JL (2010). Dietary probiotic live yeast modulates antioxidant enzyme activities and gene expression of sea bass (*Dicentrarchus labra*) larvae. *Aquaculture*, 300:142-147.

Tremaroli V y Bäckhed F (2012). Functional interactions between the gut microbiota and host metabolism. *Nature*, 489:242-249.

Trushenski J, Schwarz M, Pessoa WVN, Mulligan B, Crouse C, Gause B, Yamamoto F, Delbos B (2013). Amending reduced fish-meal feeds with marine lecithin, but not soy lecithin, improves the growth of juvenile cobia and may attenuate heightened responses to stress challenge. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 97:170-180.

Tseng DY, Ho PL, Huang SY, Cheng SC, Shiu YL, Chiu CS, Liu CH (2009). Enhancement of immunity and disease resistance in the white shrimp, *Litopenaeus vannamei*, by the probiotic, *Bacillus subtilis* E20. *Fish and Shellfish Immunology*, 26:339-344.

Turner N, Else PL, Hulbert AJ (2003). Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for diseases states and metabolism. *Naturwissenschaften*, 90:521-523.

Uma A, Abraham TJ, Sundararaj V (1999). Effect of a probiotic bacterium, *Lactobacillus plantarum* on disease resistance of *Penaeus indicus* larvae. Indian Journal Fisheries, 46:367-373.

Urdaci MC, Regnault B, Grimont PAD (2001) Identification by *in situ* hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarrheic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Research in Microbiology, 152:67-73.

Urdaneta V, Gil-Pulido B, García de la Banda I, Lobo, Moriñigo MA, Martínez-Manzanares E (2012). Study of gut microbiota in proximal and distal region of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) at three different cultured systems. European Congress of Aquaculture, Praga (República Checa).

Ursell LK, Haiser HJ, Van Treuren W, Garg N, Reddivari L, Vanamala J, Dorrestein PC, Tumbaugh PJ, Knight R (2014). The intestinal metabolome: an intersection between microbiota and host. Gastroenterology, 146:1470-1476.

Valencia A, Sapp E, Kimm JS, McClory H, Reeves PB, Alexander J, Ansong KA, Masso N, Frosch MP, Kegel KB, Li X, DiFiglia M (2013). Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease. Human Molecular Genetics, 22:1112-1131.

Valente LMP, Cabral E, Batista S, Bacelar M, Castro-Cunha M, Osorio ROA (2011). Sustainable diets for Senegalese sole. European Congress of Aquaculture, Rodas (Grecia).

Van Baarlen P, Kleerebezem M, Wells JM (2013). Omics approaches to study host-microbiota interactions. Current Opinion in Microbiology, 16:270-277.

Van der Gast CJ, Jefferson B, Reid E, Robinson T, Bailey MJ, Judd SJ, Thompson IP (2006). Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. Environmental Microbiology, 8:1048-1055.

Van der Marel M, Schroers V, Neuhaus H, Steinhagen D (2008). Chemotaxis towards, adhesion to, and growth in carp gut mucus of two *Aeromonas hydrophila* strains with different pathogenicity for common carp, *Cyprinus carpio* L. Journal of Fish Diseases, 31:321-330.

Van Weerd JH y Komen J (1998). The effects of chronic stress on growth in fish: a critical appraisal. Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular and Integrative Physiology, 120:107-112.

Vadstein O, Bergh Ø, Gatesoupe FJ, Galindo-Villegas J, Mulero V, Picchietti S, Bossier P (2013). Microbiology and Immunology of fish larvae. Reviews in Aquaculture, 5:S1-S25.

Vandesompele J, De Preter K, Pattyn F, Poppe B, Van Roy N, De Paepe A, Speleman F (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. Genome Biology, 3:1-11.

Van Hai N (2012). The use of medicinal plants as immunostimulants in aquaculture: A review. Aquaculture, 446:88-96.

Van Immerseel F, Russell JB, Flythe MD, Gantois I, Timbermont L, Pasmans F, Haesebrouck F, Ducatelle R (2006). The use of organic acids to combat *Salmonella* in poultry: a mechanistic explanation of the efficacy. *Avian Pathology*, 35:182-188.

Varela JL, Ruíz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Arijó S, León-Rubio JM, García-Millán I, Río MPM, Moriñigo MA, Mancera JM (2010). Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture*, 309:265-271.

Vendrell D, Balcázar JL, de Blas I, Rui-Zarzuela I, Gironés O, Múzquiz JL (2008). Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, 31:337-345.

Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000). Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 64:655-671.

Vieira L, Erzini K, Bexiga C, Sá R, Veiga P (2003). Diets of the sole *Solea vulgaris* Quensel (1806) and *Solea senegalensis* Kaup (1858) in the lower estuary of the Guadiana river (Algarve, Southern Portugal): preliminary results. *Boletín del Instituto Español de Oceanografía*, 19:505-508.

Vilar P, Faílde LD, Bermúdez R, Vigliano F, Riaza A, Silva R, Santos Y, Quiroga MI (2012). Morphopathological features of a severe ulcerative disease outbreak associated with *Tenacibaculum maritimum* in cultivated sole, *Solea senegalensis* (L.). *Journal of Fish Diseases*, 35:437-445.

Villalta M, Estévez A, Bransden MP, Bell JG (2005a). The effect of graded concentrations of dietary DHA on growth, survival and tissue fatty acid profile of Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture*, 249:353-365.

Villalta M, Estévez A, Bransden MP. (2005b). Arachidonic acid enriched live prey induces albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae. *Aquaculture*, 245:193-209.

Villalta M (2007). Requerimientos nutricionales en ácidos grasos esenciales y organogénesis de la larva del lenguado senegalés, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). Tesis doctoral. Universidad Autónoma de Barcelona. Barcelona (España).

Villalta M, Estévez A, Bransden MP, Bell JG (2008a). Arachidonic acid, arachidonic/eicosapentaenoic acid ratio, stearidonic acid and eicosanoids are involved in dietary-induced albinism in Senegal sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture Nutrition*, 14:120-128.

Villalta M, Estévez A, Bransden MP, Bell JG (2008b). Effects of dietary eicosapentaenoic acid on growth, survival, pigmentation and fatty acid composition in Senegal sole (*Solea senegalensis*) larvae during the *Artemia* feeding period. *Aquaculture Nutrition*, 14:232-241.

Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B (2010). *Pediococcus acidilactici* in the culture of turbot (*Psetta maxima*) larvae: administration pathways. *Aquaculture*, 307:83-88.

Vinderola G, Matar C, Palacios J, Perdigon G (2007). Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. International Journal Food Microbiology, 115:180–186.

Vine NG, Leukes WD, Kaiser H, Daya S, Baxter J, Hecht T (2004). Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. Journal of Fish Diseases, 27:319-326.

Walker WA (2008). Mechanisms of action of probiotics. Clinical Infectious Diseases, 46:S87-S91.

Wallner G, Fuchs B, Spring S, Beisker W, Amann R (1997). Flow sorting of microorganisms for molecular analysis. Applied Environmental Microbiology, 63:4223-4231.

Wang YB y Xu ZR (2006). Effect of probiotics for common carp (*Cyprinus carpio*) based on growth performance and digestive enzyme activities. Animal Feed Science and Technology, 127:283–292

Wang JT, Chang SC, Wang HY, Chen PC, Shiau YR, Lauderdale TL (2013). High rates of multidrug resistance in *Enterococcus faecalis* and *E. faecium* isolated from inpatients and outpatients in Taiwan. Diagnostic microbiology and Infectious Disease, 75:406-411.

Warger T, Hilf N, Rechtsteiner G, Haselmayer P, Carrick DM, Jonuleit H, von Landenberg P, Rammensee HG, Nicchitta CV, Radsak MP, Schild H (2006). Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses. Journal Biological Chemistry, 281:22545-22553.

Weber RA, Pérez-Maceira JJ, Peleteiro JB, García-Martín L, Aldegunde M (2011). Effects of acute exposure to 2-phenoxyethanol, clove oil, MS-222, and metomidate on primary and secondary stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup 1858). Aquaculture, 321:108-112.

Weber RA, Maceira JP, Mancebo MJ, Peleteiro JB, Martín LG, Aldegunde M (2012). Effects of acute exposure to exogenous ammonia on cerebral monoaminergic neurotransmitters in juvenile *Solea senegalensis*. Ecotoxicology, 21:362-369.

Weber RA, Pérez Maceira JJ, Aldegunde MJ, Peleteiro JB, García Martín LO, Aldegunde M (2015). Effects of acute handling stress on cerebral monoaminergic neurotransmitters in juvenile Senegalese sole, *Solea senegalensis*. Journal of Fish Biology, DOI:10.1111/jfb.12774

Wedemeyer GA, Barton BA, McLeay DJ (1990). Stress and acclimation. In C. B. Schreck and P. B. Moyle (eds.), Methods for Fish Biology, 451–489.

Wendelaar-Bonga SE (1997). The stress response in fish. Physiology Revision, 7:591–625.

Wiest R, Lawson M, Geuking M (2014). Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. Journal of Hepatology, 60:197-209.

Wittebolle L, Vervaeren H, Verstraete W, Boon N (2008). Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Applied and Environmental Microbiology*, 74:286-293.

Won-Seok H, Kim YR, Kim EY, Bai SC, Kong IS (2013). Effects of dietary probiotic, *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* I2, supplementation on the growth and immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*). *Aquaculture*, 376: 20-24.

Wong S y Rawls JF (2012). Intestinal microbiota composition in fishes is influenced by host ecology and environment. *Molecular Ecology*, 21:3100-3102.

Wong S, Stephens WZ, Burns AR, Stagaman K, David LA, Bohannan BJ, Guillemin K, Rawls JF (2015). Ontogenetic differences in dietary fat influence microbiota assembly in the zebrafish gut. *mBio*, 6:00687-00715.

Woodcock S, Van Der Gast CJ, Bell T, Lunn M, Curtis TP, Head IM, Sloan WT (2007). Neutral assembly of bacterial communities. *FEMS Microbiology Ecology*, 62:171-180.

Wunderink YS, Engels S, Halm S, Yúfera M, Martínez-Rodríguez G, Flik G, y col. (2011). Chronic and acute stress responses in Senegalese sole (*Solea senegalensis*): The involvement of cortisol, CRH and CRH-BP. *General and Comparative Endocrinology*, 171:203-210.

Wunderink YS, Martínez-Rodríguez G, Yúfera M, Martín-Montero I, Flik G, Mancera JM, Klaren PH (2012). Food deprivation induces chronic stress and affects thyroid hormone metabolism in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) post-larvae. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A. Molecular and Integrative Physiology*, 162:317-322.

Xingyi Z, Huan Z, Huaizheng L, Wei F (2010). Advances in aquaculture water biological treatment technology. *Technology of Water Treatment*, 1:007.

Yang L, Jelsbak L, Marvig R, Damkiær CT, Rau MH, Molin S, (2011). Evolutionary dynamics of bacteria in a human host environment. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108:7481-7486.

Yano T (1996). The nonspecific immune system: humoral defense. In *The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment*, (Ed. by G. Iwama, and T. Nakanishi. Academic Press, San Diego, USA.

Yuangklang C, Wensing T, Van den Broek L, Jittakhot S, Beynen AC, Effect of oxytetracycline supplementation on nutrient digestibility in veal calves. *Animal Feed Science and Technology*, 118:161-166.

Zacarias-Soto M, Lazo JP, Viana MT (2011). Effect of three probiotics administered through live feed on digestive enzyme activity in California halibut, *Paralichthys californicus*, larvae. *Journal of the World Aquaculture Society*, 42:321-331.

Zapata AG, Chibá A, Varas A (1996). Cells and tissue of the immune system of fish. The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment, G. Iwama & T. Nakamishi (Eds.).

Zarza C y Padrós F, (2008). An overview of diseases of farmed sole. In IV International Sole Workshop, Faro (Portugal).

Zebulun HO, Inyang HI, Hilger H (2013). Molecular and biological techniques used in landfill investigations: A mini-review. Biotechnology and Molecular Biology Reviews, 8:35-42.

Zhang Y, Lin J, Zhong Q. (2016). S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. Food Hydrocolloids, 52:804-810.

Zhao JH, Meng XL, Zhang J, Li YL, Li YJ, Fan ZM (2014). Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation injury: Role of HSP70 and inhibition of apoptosis. Journal of Huazhong University of Science and Technology, 34:18-22.

Zhigang Z (2011). Evaluation of probiotic strain *Bacillus subtilis* C-3102 as a feed supplement for koi carp (*Cyprinus carpio*). Journal of Aquaculture Research and Development, S1:005.

Zhou X, Tian Z, Wang Y, Li W (2010). Effect of treatment with probiotics as water additives on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Fish Physiology and Biochemistry, 36:501-509.

Zokaifar H, Balcázar JL, Saad CR, Kamarudin MS, Sijam K, Arshad A, Nejat N (2012). Effects of *Bacillus subtilis* on the growth performance, digestive enzymes, immune gene expression and disease resistance of white shrimp, *Litopenaeus vannamei*. Fish and Shellfish Immunology, 33: 683-689.

Zorrilla I, Balebona MC, Moriñigo MA, Sarasquete C, Borrego JJ (1999). Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp. *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Journal of Fish Diseases, 22:167-172.

Zorrilla I, Arijó S, Chabrállón M, Díaz P, Marínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriñigo MA (2003). *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. Journal of Fish Diseases, 26:103-108.

Páginas web visitadas:

<http://www.fao.org/docrep/016/ba0056e/ba0056e.pdf>

<http://www.who.int/foodsafety>

ANEXOS



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-online

Short communication

Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms



Silvana Teresa Tapia-Paniagua^a, Patricia Díaz-Rosales^a, Inés García de la Banda^b, Carmen Lobo^b, Encarnación Clavijo^c, M^a. Carmen Balebona^a, Miguel Angel Morínigo^{a,*}

^a Department of Microbiology, Group of Prophylaxis and Biocontrol of Fish Diseases, Faculty of Sciences, University of Malaga, 29071, Málaga, Spain

^b Spanish Institute of Oceanography, C. O. Santander, Promontorio S. Martín s/n., Ap. 240, 39080, Santander, Spain

^c Faculty of Medicine, University of Malaga, 29071, Málaga, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 30 October 2013

Received in revised form 27 December 2013

Accepted 1 January 2014

Available online 15 January 2014

Keywords:

Probiotics

Microbiota

Solea senegalensis

Fatty acids

ABSTRACT

Fish intestinal microbiota is a complex ecosystem involved in essential functions such as digestion and nutrition and it is influenced by a range of factors. Probiotics are administered to farmed fish through the diet, being able to affect the intestinal microbiota. The aim of this study is to evaluate the effect of the dietary administration of two probiotic diets containing two *Shewanella* spp. strains, Pdp11 and Pdp13 (diets II and III) on the intestinal microbiota of farmed *Solea senegalensis* specimens, as well as on the fatty acid contents of their liver.

The results demonstrate a modulation of sole intestinal microbiota by assayed probiotic diets. Both probiotic diets increased the presence of *Shewanella* spp. members in the microbiota. This increase was especially important in fish treated with Pdp13, where changes also included decreased presence of *Vibrio* spp. members. In addition, principal component analysis of data obtained indicates correlation between species observed in fish fed Pdp13 and liver linoleic and linolenic acid levels. Moreover, species comprising the intestinal microbiota in fish fed Pdp11 were related to lower lipid droplet presence in liver and enterocytes.

© 2014 Published by Elsevier B.V.

1. Introduction

Aquaculture is an expanding industry, and one of its most serious problems is the presence of infectious diseases. Control of bacterial pathogens is achieved by the use of antimicrobials, but this has provoked increasing antibiotic resistances in fish pathogens (Akinbowale et al., 2006) and an environmental impact by its permanence in the systems (Costello, et al., 2001). Probiotics represent an interesting contribution in the prevention and treatment of infectious diseases thanks to their ability to stimulate fish immune system and inhibit bacterial pathogens (Balcázar et al., 2006; Kim and Austin, 2006; Sharifuzzaman and Austin, 2010). Diet is the most frequent administration for probiotics, which can exert some effects on the intestinal microbiota (Merrifield et al., 2010). Contribution of the intestinal microbiota to fish nutrition and host immunity has been reported by several authors (Picchietti et al., 2007; Semova et al., 2012). In addition, fish intestinal microbiota is sensitive to a wide range of environmental factors, among which probiotics can be con-

sidered. For this reason, interactions between probiotic microorganisms and fish intestinal microbiota need to be studied. In previous studies, we have isolated two probiotic strains from gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) skin, named Pdp11 and Pdp13 and identified as *Shewanella putrefaciens* and *Shewanella baltica*, respectively (Díaz-Rosales et al., 2009). These probiotics showed antagonistic activity against fish pathogens and ability to enhance the immunological response and growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) specimens (Díaz-Rosales et al., 2009; García de la Banda et al., 2010; Sáenz de Rodríguez et al., 2009). The present work is part of a comprehensive study on the effects of probiotic administration to cultured Senegalese sole. In a previous work significant differences in liver fatty acid profiles and denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) patterns of the intestinal microbiota were detected in fish fed probiotic supplemented diets compared to specimens fed a control diet (García de la Banda et al., 2010). In order to obtain a wider perspective of the influence of probiotics on fish microbiota and their role on lipid metabolism, intestinal microbiota composition has been determined in the present work. Moreover, the relationship between microbial species and liver lipid contents in fish fed both probiotics has been addressed by principal component analysis.

The aim of this study is to evaluate the effect of the oral administration of these two probiotic microorganisms on the structural diversity of

* Corresponding author at: Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Malaga, 29071, Málaga, Spain. Tel.: +34 952131862; fax: +34 952136645.

E-mail address: morinigo@uma.es (M.A. Morínigo).

the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole determining the predominant microorganisms and their effect on the levels of essential fatty acids in fish liver.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

Shewanella putrefaciens Pdp11 and *Shewanella baltica* Pdp13 cells were stored at -80°C in tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 15 g/L NaCl (TSBs) and 15% (v/v) glycerol for long-term storage. For the experiments bacterial strains were grown in tubes containing 5 ml (TSBs) for 18 h at 22°C , with continuous shaking, appropriate dilutions of the cultures were spread onto tryptone soya agar (Oxoid) plates supplemented with 1.5% NaCl (TSAs) and confirmed as Pdp11 and Pdp13 by 16S rDNA gene sequencing according to Díaz-Rosales et al. (2009). Bacterial suspensions were prepared by cell scraping from the plates and washing in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The number of total cells was determined by using a cell counting chamber (Marienfeld, Germany) and adjusted to 1.8×10^{11} cells/ml. Bacterial suspensions (12 ml) were frozen and freeze-dried according to Tapia-Paniagua et al. (2010).

2.2. Fish and experimental diets

One hundred forty healthy farmed Senegalese sole specimens (26.7 ± 4.6 g mean body weight) from the stocks of the Spanish Oceanographic Institute of Santander (IEO) were randomly distributed in 150-L seawater tanks connected to an open circulating system (35.4 g/L salinity, $16.6^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$). After a 2-week acclimatization period, ten fish were sampled for bacteriology. The specimens were dissected and samples of spleen, liver and kidney were cultured on TSAs at 22°C for 48 h to confirm the health status of fish. Fish were fed eight times a day with either experimental or commercial pellet diet Gemma 1.8 (22% total lipids and 50% crude protein, SKRETTING, Burgos, Spain) for 69 days. Long period feeding was considered based on the increased growth and nutrient utilization observed in juvenile Senegalese sole fed similar probiotic diets (Sáenz de Rodríguez et al., 2009). Initial fish weight was used to adjust the daily ration of feed according to the normal pattern in this species (20 g/kg fish).

Experimental diets were prepared in the laboratory by supplementing the commercial feed with Pdp11 and Pdp13 lyophilized bacterial cells (diet II and diet III, respectively) as described by Tapia-Paniagua et al. (2010), to obtain a dose of 10^9 CFU/g feed which produces benefits in *S. senegalensis* (Sáenz de Rodríguez et al., 2009). Culturable cells in the feed were determined by plate count as previously specified. A control diet was prepared by supplementing pellets with sodium alginate and calcium chloride. Each experimental diet was assayed in triplicate. Specific growth rate (SGR) was calculated using the following equation: $\text{SGR} = [(\ln W_t - \ln W_o)/(t - t_o)] \times 100$, where, W_t and, W_o are the individual mean weight at the end and at the beginning of the experiment, respectively; and t represents time in days.

2.3. Biochemical and histological analysis

Nine specimens of each diet were sacrificed by ice-bath chilling at the end of the experiment. Liver samples were collected and stored at -80°C until composition analysis. Crude protein contents were determined by Bradford (1976) and total lipids by extraction with chloroform-methanol 2:1 (v/v) (Fernández-Reiriz et al., 1989) and gravimetric determination. Fatty acids prior to transesterification and methylation were analyzed by gas chromatography (8700 Perkin Elmer, Beaconsfield, UK). Digestive tract and liver sections were processed for histological analysis and lipid droplet counting following the methodology described by García de la Banda et al. (2010).

2.4. Analysis of the intestinal microbiota

Whole intestines of eight fish per diet were aseptically removed after a 69-day assay period and stored separately at -80°C until further analysis. Individual intestinal lumen contents were collected with 1 ml PBS pH 7.2, and a 1 ml aliquot was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. Total DNA was extracted from each sample as described by Martínez et al. (1998). Pure cultures of the probiotic strains Pdp11 and Pdp13 were grown to exponential phase in TSBs and centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min. Pellets were washed with PBS and used for DNA extraction following Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA) instructions. DNA was amplified using the 16S rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F (5'-GAACGCGAAGAACCTTAC-3') and 1401-R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'). Primer 968-CG-F carries a 40 b GC clamp. PCR mixtures and conditions to perform PCR were those previously described by Tapia-Paniagua et al. (2010). The amplicons obtained were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) according to Muyzer et al. (1993) specifications using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The gels were subsequently stained with AgNO₃ (Sanguinetti et al., 1994).

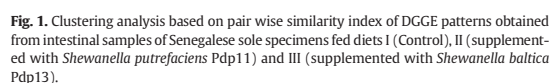
DGGE banding patterns and intensities were analyzed using FPQuest Software version 4.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A matrix of similarities for the densitometric curves of the band patterns was calculated using the band-based Pearson coefficient. Clustering of DGGE patterns was achieved by construction of dendrograms using the unweighted pair groups method with arithmetic averages (UPGMA). Structural diversity of the microbial community was determined with an analysis of the DGGE-patterns considering that a relevant band must be present in the DGGE patterns of at least five out to eight specimens analyzed per diet. Species richness (R) was calculated based on the total number of bands, and Shannon diversity index (H') according to the expression: $H' = -\sum P_i \log P_i$, where P_i is defined as (n_i/N), n_i is the peak surface of each band, and N is the sum of the peak surfaces of all bands. Predominant bands in the DGGE gels were sequenced following the methodology previously described by Tapia-Paniagua et al. (2010). These bands were compared with the sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST sequence algorithm (Altschul et al., 1990).

Table 1

Similarity (Pearson coefficient), species richness (R) and Shannon's index (H') values of the DGGE patterns of intestinal microbiota of Senegalese sole specimens fed different diets.

	Diet I	Diet II	Diet III
Features of intestinal microbiota			
Similarity (%)	58.00	78.00	97.00
Richness (R)	26.7 ± 0.6	27.3 ± 0.6	26.0 ± 0.0
Shannon's index (H')	2.5 ± 0.1^a	2.4 ± 0.01^a	1.8 ± 0.01^b
Metabolic features			
SGR weight	0.7 ± 0.1^a	0.6 ± 0.1^a	0.5 ± 0.1^b
Total proteins	36.6 ± 6.6	32.7 ± 2.2	29.4 ± 5.2
Total lipids	34.8 ± 4.0	37.9 ± 2.3	39.7 ± 6.7
Omega-3 (n-3)	35.4 ± 7.3	32.6 ± 1.4	31.5 ± 3.8
Omega-6 (n-6)	7.3 ± 0.9^a	8.6 ± 0.4^b	8.8 ± 0.3^b
22:6n-3 DHA	21.4 ± 1.6^a	19.3 ± 1.3^{ab}	17.3 ± 0.7^b
20:5n-3 EPA	4.1 ± 1.2	4.0 ± 0.8	4.1 ± 1.3
20:4n-6 ARA	2.3 ± 0.9	1.8 ± 0.4	1.7 ± 0.2
18:3n-3	0.8 ± 0.1^a	1.4 ± 0.03^b	1.5 ± 0.1^b
18:2n-6	5.1 ± 0.2^a	6.8 ± 0.2^b	7.1 ± 0.2^b
Intestinal LD	55.4 ± 1.1^a	43.4 ± 0.9^b	57.1 ± 1.1^a
Liver LD	56.3 ± 1.1^a	24.0 ± 3.2^b	58.0 ± 0.5^a

Diet I: control diet; diet II: supplemented with the probiotic *S. putrefaciens* Pdp11; diet III: supplemented with the probiotic *S. baltica* Pdp13. Metabolic features including specific growth rate (SGR) (% weight day⁻¹) and liver percentages of proteins, lipids, fatty acids (g/100 g tissue), and intestinal and liver lipid droplets (LD) reported by García de la Banda et al. (2010) have been included for comparison purposes. Except for similarity percentage, values are expressed as mean \pm standard deviation. Results in the same row with different letters are significantly different ($p < 0.05$).



Sequences reported in this study have been submitted to the National Center for Biotechnology Information (NCBI) under the following GenBank accession numbers: HQ416679 to HQ416690 and HQ621856. In addition, Pdp11 and Pdp13 sequences were submitted to GenBank under the accession numbers JX415533 and JX415534, respectively.

Kruskal-Wallis test was used to test the significance of the differences in species richness (R) and species diversity (H') using the program STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statgraphics Corporation, Rockville, MD, USA). PCA was applied to correlate variables determined in the liver of fish fed assayed diets and microbial species detected in the intestinal microbiota using XLSTAT 2012 software (Addinsoft, Spain) and orthogonal transformation (Varimax).

The values of R did not show significant differences among fish fed all diets (Table 1), whereas the H' values were significantly lower for fish fed diet III compared to those fed diets I and II (Table 1). Furthermore, a clustering analysis was applied to the intestinal microbiota DGGE patterns of *S. senegalensis* juveniles fed control and probiotic diets (Fig. 1). Supplementation of the diet with the probiotics resulted in high intragroup similarity percentages (78% and 97%) for fish fed diets II and III, respectively, whereas this percentage was 58% in fish fed diet I (Table 1). Thus, results obtained indicate the presence of a more similar intestinal microbiota in fish fed probiotic diets compared to control fish.

The values of specific growth rate (SGR), and the percentages of protein, lipids and fatty acids measured in the liver of control and probiotic fed fish reported in our previous study (García de la Banda et al., 2010) are summarized in Table 1. These data have been incorporated to the PCA study to establish a possible correlation among these variables and the intestinal microbiota composition.

Bands showing higher intensities in DGGE gels were sequenced and compared with BLAST references based on the phylogenetic relationship of the ~500 bp partial 16S rDNA sequence (Table 2). The bands were mainly related to species such as *S. putrefaciens* Pdp11, *S. decolorationis*, *S. baltica* *S. piezotolerans*, *V. alginolyticus*, *V. breoganii* and *V. campbellii*. In fish fed diet III the bands related to *Shewanella* genus showed increased intensity, whereas decreased intensity of the bands related to *Vibrio* genus was also observed (Table 2). Bands 16 and 30 were identified as the probiotic strains *S. putrefaciens* Pdp11 and *S. baltica* Pdp13, respectively.

PCA was applied to metabolic data included in Table 1 and microbiota composition species identified from DGGE patterns. Only species detected in at least 5 out of 8 fish have been considered. Correlation among variables is represented in Fig. 2. Two principal components account for

Band	Closest relative	Similarity (%)	GenBank accession	Percentage of intensity		
				Diet I	Diet II	Diet III
1.	<i>Shewanella baltica</i> clone GR-WP39-25	92	AJ301575	3.33 (4)	4.33 (6)	0
3.	<i>Shewanella putrefaciens</i>	91	HQ588327	3 (5)	4 (5)	0
5.	<i>Shewanella</i> sp ANA-3	99	CP000469	6.33 (6)	0	6 (8)
6.	<i>Vibrio alginolyticus</i> partial CECT 609	99	FM204870	8.33 (8)	3 (4)	0
9.	Uncultured <i>Vibrio</i> sp clone 2	97	AY785249	6 (5)	4.33 (7)	0
16.	<i>Shewanella putrefaciens</i> Pdp11	99	JX415533	0	8.66 (8)	0
19.	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	99	AJ421444	4.33 (4)	2 (4)	1.6 (7)
20.	<i>Vibrio breoganii</i> strain RD 2B2	94	EU931113	1 (2)	4.66 (6)	1.66 (3)
23.	<i>Vibrio</i> sp SB-E2 g	91	AB457052	1.66 (4)	5.33 (5)	0.66 (2)
25.	<i>Shewanella putrefaciens</i> strain ZH29	99	HM103349	0	6.33 (5)	0.66 (2)
26.	<i>Shewanella decolorationis</i> CCTCCM 203093 T	96	AJ609571	0	0	9 (8)
27.	<i>Shewanella</i> MJ 5323	97	DQ531951	0	5.66 (7)	5.66 (7)
30.	<i>Shewanella baltica</i> Pdp13	98	JX415534	0	0	11.33 (8)
31.	<i>Shewanella piezotolerans</i> WP3	95	AY551090	0	0	6.66 (8)
32.	<i>Mucus bacterium</i> 19	96	AJ654742	3 (2)	1 (6)	1 (6)

The number of specimens showing the band is indicated inside brackets.

more than 90% (93.36%) of the total data variability. The analysis of PCA results showed a clear split of microbial bands and metabolic parameters in two groups along the first PC axis F1 (Fig. 2A). In this context, a positive correlation ($\geq 75\%$) was detected for bands 1, 3, 6, 9, 19 and 32, proteins and fatty acids, such as C20:4n-6 and C22:6n-3 and F1 component. On the other hand, bands 26, 27, 30 and 31, fatty acids n-6, C18:2n-6 (linoleic acid) and C18:3n-3 (linolenic acid) and lipids showed negative correlation with the component F1. The first group of bands was only jointly included in fish fed diets I and II (Table 2). The second group of bands was only present in the DGGE patterns of the majority of the specimens fed diet III. On the other hand, a different split of microbial bands was observed along the second PC axis, F2 (Fig. 2A). In this case, band 5, C20:5n-3 and lipid droplets inside enterocytes and hepatocytes showed negative correlation with F2 component, whereas bands 16, 20, 23 and 25 were positively correlated with this component. This group of bands was only jointly present in the DGGE patterns of fish fed diet II (Table 2). Fish fed diets I and III

were split in two clear groups, diet I scoring positive and diet III scoring negative on F1 axis (Fig. 2B).

4. Discussion

Ecosystem function and stability are influenced by species and functional group richness (Bell et al., 2005) biodiversity being essential in the protection of ecosystems against declines in their functionality (Wittebolle et al., 2008). In this context, the dietary supplementation with the probiotics assayed did not result in changes in the species richness of the DGGE patterns compared to patterns obtained for fish receiving control diet. This result contrasts with those reported in other studies which have shown that the probiotic feeding induced a decrease of the diversity (Cerezuela et al., 2013; Ferguson et al., 2010). However, the long term application of the probiotic treatment used in our study may allow the adaptation of the ecosystem to the probiotic presence by the establishment of new species in the microbiota. However, probiotic dietary administration produced lower intragroup variability of the intestinal microbiota, it being specially marked in fish fed diet III. In addition, no significant differences have been observed in diversity Shannon index (H') values for fish fed diets I and II, whereas fish fed diet III showed lower H' rates, indicating lower evenness of the individuals among the bacterial species. The microbial community could be functionally organized but it would be more fragile to external changes and alterations introduced in this system may require longer recovery times (Marzorati et al., 2008). Intestinal microbiota has been reported to affect nutrient absorption and energy homeostasis (Miele et al., 2013). Decreased SGR reported by García de la Banda et al., 2010 in fish fed diet III may be attributed to the potential reduction of the functionality of the intestinal microbiota observed in the present study. However, more studies are necessary for concluding results in *Solea senegalensis*.

In a previous study carried out by our research group with Senegalese sole fed diets assayed in the present work, García de la Banda et al. (2010) reported SGR values significantly lower ($0.5\% \text{ day}^{-1}$) for fish fed diet III compared to fish fed diets I and II (0.7 and $0.6\% \text{ day}^{-1}$, respectively). In addition, fish receiving diets II and III showed significantly higher levels of n-6 and 18:3n-3 and 18:2n-6 fatty acids in liver compared to fish fed control diet. On the contrary, levels of 22:6n-3 for fish fed diet III, were significantly lower than those detected for fish fed diet I. Counts of LD inside enterocytes and hepatocytes showed significantly ($p < 0.05$) lower percentages (43.4% and 24%, respectively) in fish fed diet II, compared to LD percentages calculated for fish fed diets I (55.4% and 56.3%, respectively) and III (57.1% and 58%, respectively) (Table 1).

In the present work, previous physiologic data along with fish intestinal microbiota analysis have been included in a principal components analysis. PCA produced two components, F1 and F2 accounting for more than 90% of the total variability of the data. A group of metabolic parameters including protein, 22:6n-3 and 20:4n-6 levels and the DGGE bands 1, 3, 6, 9, 19 and 32, which were jointly present only in DGGE patterns of fish fed diets I and II were positively correlated with F1 component. These bands were sequenced and related to *Shewanella* genus, and species *V. alginolyticus*, *Vibrio penaeicida* and a bacterium related to the *Vibrio* genus (data not shown). Presence of *Vibrio* species could explain the higher level of 22:6n-3 detected in the liver of fish fed diet I compared to decreased levels observed in fish receiving diet II, and specially diet III. *Vibrio* genus is included in a narrow group of γ -Proteobacteria that have a fatty acid synthase system (*Pfa* synthase) responsible for the specific *de novo* synthesis of HUFA such as 22:6n-3 (Dague et al., 2006). This HUFA plays a significant role in marine fish nutrition, being involved in the maintenance of the structural and functional integrity of biological membranes (Turner et al., 2003). On the other hand, levels of n-6, and 18:3n-3, 18:2n-6 acids and bands 26, 27, 30 and 31 were negatively correlated with F1. These bands, phylogenetically related to *Shewanella* genus, were only present in the DGGE patterns of the specimens fed diet III, thus indicating an association between the presence of *Shewanella* spp. in the intestinal microbiota and higher

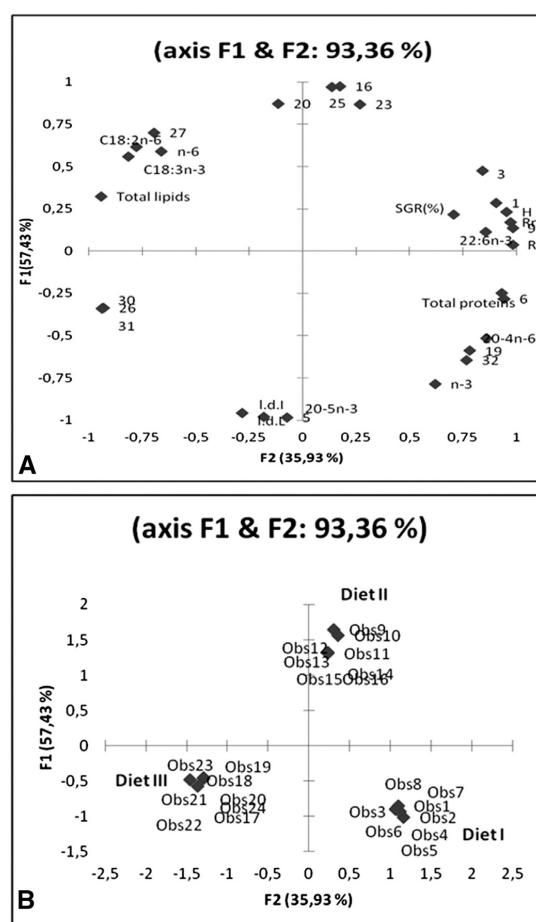


Fig. 2. Principal component analysis (PCA) applied to liver and microbiota composition of control and probiotic fed fish. (A) Correlation of assayed variables and principal components accounting for 93% variability. SGR: specific growth rate; LDL and LDL: intestinal and liver lipid droplets, respectively; Numbers correspond to sequenced bands detected in DGGE patterns of at least 5 out of 8 fish. (B) Distribution of *Solea senegalensis* specimens fed diets I (control diet) and probiotic diets II (Pdp11) and III (Pdp13) along axis F1 and F2.

levels of n-6, 18:3n-3 and 18:2n-6 acids detected in the liver of fish fed diet III. The role of 18:3n-3 in the regulation of the immune system has been reported (Ramírez-Santana et al., 2009). In this context, an immunostimulatory effect of the strains Pdp11 and Pdp13 has been observed in Senegalese sole (Díaz-Rosales et al., 2009) and increased resistance against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* has been reported in this fish species (Díaz-Rosales et al., 2009; García de la Banda et al., 2010).

It is frequent to detect lipid dumps in the liver of farmed fish, and their accumulation can lead to the syndrome named steatosis or fatty liver, responsible for delayed growth, onset of diseases and even fish death (Gang et al., 2006). García de la Banda et al. (2010) reported lower lipid droplets (LD) levels inside enterocytes and hepatocytes of Senegalese sole specimens fed diets supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11, in comparison with fish fed a control diet and a diet supplemented with *S. baltica* Pdp13. In the present study, a group of bands observed only in the DGGE patterns of specimens fed diet II were positively correlated with F2, while the presence of lipid droplets inside enterocytes and hepatocytes showed negative correlation with F2 component. These bands were corresponded to *Vibrio* and *Shewanella* species, including the probiotic Pdp11. Lower percentages of hepatocytic lipid droplets could be related to higher levels of 18:3n-3 acid detected in the liver of fish fed diet II, because this acid has shown lipolipidic effects (Ide, 2000). However, similar 18:3n-3 acid levels have been found in the liver of fish fed diet III, which showed also higher LD counts. This potential relationship is unresolved and further studies considering interactions among species and with fish intestines in order to influence fatty acid production need to be carried out. The correlation between fish intestinal microbiota of fish fed diet II and lower LD levels is in agreement with data reported by Semova et al. (2012), who denote the influence of the microbiota composition on fat absorption and formation of different lipid droplet (LD) phenotypes inside the enterocyte, affecting the number and size of the LD.

In conclusion, results obtained in this study demonstrate a differential ability of two probiotics, *S. putrefaciens* Pdp11 and *S. baltica* Pdp13 to modulate the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole, and the different correlation that this modulation can exert on essential fatty acid levels in the liver as well as LD inside enterocytes and hepatocytes.

Acknowledgements

The authors received the financial support from the *Ministerio Español de Ciencia y Tecnología* (AGL2008-05119-C02-02 and AGL2011-30381-C03-02). S. Tapia-Paniagua wishes to thank the *Ministerio Español de Educación y Ciencia* for a F.P.U. scholarship.

References

- Akinbowale, O.L., Peng, H., Barton, M.D., 2006. Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J. Appl. Microbiol.* 100, 1103–1113.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Balcázar, J.L., de Blas, I., Ruiz-Zarzuela, I., Cunningham, D., Vendrell, D., Múzquiz, J.L., 2006. The role of probiotics in aquaculture. *Vet. Microbiol.* 114, 173–186.
- Bell, T., Newman, J.A., Silverman, B.W., Turner, S.L., Lilley, A.K., 2005. The contribution of species richness and composition to bacterial services. *Nature* 436, 1157–1160.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cerezuela, R., Fumanal, M., Tapia-Paniagua, S.T., Messeguer, J., Moriño, M.A., Esteban, M.A., 2013. Changes in intestinal morphology and microbiota caused by dietary administration of inulin and *Bacillus subtilis* in gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) specimens. *Fish Shellfish Immunol.* 34 (5), 1063–1070.
- Costello, M.J., Grant, A., Davies, I.M., Cecchini, S., Papoutsoglou, S., Quigley, D., Saroglia, M., 2001. The control of chemicals used in aquaculture in Europe. *J. Appl. Ichthyol.* 17, 173–180.
- Dague, E., Jorand, F., Thomas, F., Gaboriaud, F., 2006. Probing surface structures of *Shewanella* spp by microelectrophoresis. *Biophys. J.* 90, 2612–2621.
- Díaz-Rosales, P., Ario, S., Chabrilón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 293, 16–21.
- Ferguson, R.M.W., Merrifield, D.L., Harper, G.M., Rawling, M.D., Mustafa, S., Picchetti, S., Balcázar, J.L., Davies, S.J., 2010. The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). *J. Appl. Microbiol.* 109 (3), 851–862.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreira, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83, 17–37.
- Gang, J., Jian, F., Zhibiao, Q., 2006. Studies on the fatty liver diseases of *Sciaenops ocellatus* caused by different ether extract levels in diets. *Front. Biol. China* 1, 9–12.
- García de la Banda, I., Lobo, C., León-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S.T., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L.M., Linares, F., Arce, F., Ario, S., 2010. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 306, 281–288.
- Ide, T., 2000. Effect of dietary alpha-linolenic acid on the activity and gene expression of hepatic fatty acid oxidation enzymes. *Biofactors* 13, 9–14.
- Kim, D.H., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 513–524.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24, 138–139.
- Marzorati, M., Wittebolle, L., Boon, N., Daffonchio, D., Verstraete, W., 2008. How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. *Environ. Microbiol.* 10, 1571–1581.
- Merrifield, D.L., Dimitroglou, A., Baker, R.T.M., Davies, S.J., 2010. Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilization, intestinal microbiota and related health criteria. *Aquacult. Nutr.* 16, 504–510.
- Miele, L., Marrone, G., Lauritano, C., Cefalo, Gasbarrini, A., Day, C., Grieco, A., 2013. Gut liver axis and microbiota in NAFLD: insight pathophysiology for novel therapeutic target. *Curr. Pharm. Des.* 19, 5314–5324.
- Muyzer, G., de Waal, E.C., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Picchetti, S., Mazzini, M., Taddei, A.R., Renna, R., Fausto, A.M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A., Abelli, L., 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* 22, 57–67.
- Ramírez-Santana, C., Castellote, C., Castell, M., Rivero, M., Rodríguez-Palmero, M., Franch, A., Pérez-Cano, J., 2009. Long-term feeding of the cis9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific immune response in rats. *J. Nutr.* 139, 76–81.
- Sáenz de Rodríguez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrilón, M., Smidt, H., Ario, S., León-Rubio, J.M., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquacult. Nutr.* 15, 177–185.
- Sanguinetti, C.J., Dias-Neto, E., Simpson, A.J.G., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotechniques* 17, 915–919.
- Semova, I., Carten, J.D., Stombaugh, J., Mackey, L.C., Knight, R., Farber, S.A., Rawls, J.F., 2012. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe* 12, 277–288.
- Sharifuzzaman, S.M., Austin, B., 2010. Development of protection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) to *Vibrio anguillarum* following use of the probiotic *Kocuria* SM1. *Fish Shellfish Immunol.* 29, 212–216.
- Tapia-Paniagua, S.T., Chabrilón, M., Díaz-Rosales, P., García de la Banda, I., Lobo, C., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microb. Ecol.* 60, 310–319.
- Turner, N., Else, P.L., Hulbert, A.J., 2003. Docosahexaenoic acid (DHA) content of membranes determines molecular activity of the sodium pump: implications for diseases states and metabolism. *Naturwissenschaften* 90, 521–523.
- Wittebolle, L., Vervaeren, H., Verstraete, W., Boon, N., 2008. Quantifying community dynamics of nitrifiers in functionally stable reactors. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 286–293.

Aquacult Int (2012) 20:1025–1039
DOI 10.1007/s10499-012-9509-5

Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.)

S. T. Tapia-Paniagua · P. Díaz-Rosales · J. M. León-Rubio ·
I. García de La Banda · C. Lobo · F. J. Alarcón · M. Chabrállón ·
P. Rosas-Ledesma · J. L. Varela · I. Ruiz-Jarabo · S. Arijó ·
M. A. Esteban · E. Martínez-Manzanares · J. M. Mancera ·
M. C. Balebona · M. A. Morínigo

Received: 17 May 2011 / Accepted: 6 February 2012 / Published online: 22 February 2012
© Springer Science+Business Media B.V. 2012

Abstract The application of probiotics on aquatic animals is increasing for a better fish welfare status as well as an environment-friendly activity which are actual demands of modern aquaculture industry. A bacterium from skin mucus of healthy gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) has been isolated and identified as *Shewanella putrefaciens* Pdp11. Different studies have been done to know its application as probiotic in the Senegalese sole and gilthead seabream farming. This article reviews the studies carried out with this probiotic microorganism focusing on the current knowledge of its in vitro and in vivo mechanisms of action. The results suggested that the probiotic *S. putrefaciens* Pdp11, due to its beneficial effects, could be used in the aquaculture activity of both species.

Keywords Aquaculture · Probiotics · Probiotic mechanisms of action · *Shewanella putrefaciens* Pdp11 · *Solea senegalensis* · *Sparus aurata*

S. T. Tapia-Paniagua · P. Díaz-Rosales · J. M. León-Rubio · M. Chabrállón · P. Rosas-Ledesma ·
S. Arijó · E. Martínez-Manzanares · M. C. Balebona · M. A. Morínigo (✉)
Group of Prophylaxis and Biocontrol of Fish Diseases, Department of Microbiology,
Faculty of Sciences, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain
e-mail: morinigo@uma.es

I. García de La Banda · C. Lobo
Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Santander, 39080 Santander, Spain

F. J. Alarcón
Department of Applied Biology, University of Almeria, 04120 Almería, Spain

J. L. Varela · I. Ruiz-Jarabo · J. M. Mancera
Department of Biology, Faculty of Marine and Environmental Sciences, University of Cádiz,
11510 Cádiz, Spain

M. A. Esteban
Fish Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology,
Faculty of Biology, University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

 Springer

Introduction

Growing percent of world aquatic production derives from aquaculture, whose importance is set increase dramatically as a result of overfishing of the world's waters and an increasing demand for seafood (FAO 2010). In large scale production facilities, where aquatic animals are exposed to stressful conditions, problems related to diseases and deterioration of environmental conditions often result in economic losses (Balcázar et al. 2006). Control of bacterial pathogens in fish farms has been routinely achieved by the administration of antimicrobial agents. However, the excessive use of these antimicrobials has led to the emergence of antibiotic resistant bacteria, due those drug-resistant strains carrying a transferable R-plasmid, making the treatments less successful (Akinbowale et al. 2006). In addition, the transference of resistant genes between bacteria (Schwarz et al. 2001) could have a risk to human health (Kesarcodi-Watson et al. 2008).

The modern aquaculture industry demands alternative preventive practises that may help to maintain a high animal welfare as well as a healthy environment, resulting in a better production and higher profits. Within this context, application of probiotics for aquatic animals is increasing (Gatesoupe 1999; Verschuere et al. 2000).

Probiotics are defined as a live microbial feed supplement which beneficially affects the host animal by improving its microbial balance (Fuller 1989). This definition is being constantly refined associated with health promoting properties (Spanggaard et al. 2001; Irianto and Austin 2002) or with other benefits (Verschuere et al. 2000; Farzanfar 2006). However, in aquaculture systems the interaction between the microbiota and the host is not limited to the intestinal tract, and given the nature of fish farming and the fact that water harbours microbial communities, a distinctive definition of probiotic for aquatic animals is accepted (Merrifield et al. 2010a). According to these authors “probiotic for aquaculture is a live, dead or component of a microbial cell that, when administered via the feed or to the rearing water, benefits the host by improving either disease resistance, health status, growth performance, feed utilisation, stress response or general vigour, which is achieved at least in part via improving the hosts or the environmental microbial balance”.

Growth of the marine aquaculture industry can be attributed to the culture of a few species which already shows signs of market saturation, and therefore diversification of culture species is becoming a need. In this context, Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) culture is nowadays a very promising farmed fish species in the Southern European countries (Imsland et al. 2003). However, one of the most serious problems concerning sole production is the existence of infectious diseases produced by pathogens such as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Zorrilla et al. 1999; Romalde 2002; Arijo et al. 2005a), *Vibrio harveyi* (Zorrilla et al. 2003; Arijo et al. 2005a), and species of *Tenacibaculum* (Avendaño-Herrera et al. 2005; Arijo et al. 2005a; Pineiro-Vidal et al. 2007, 2008a, b). A divalent vaccine for sole against *P. damsela* subsp. *piscicida* and *V. harveyi* has been developed, although it only provides short-time protection (Arijo et al. 2005b). For all these reasons the searching for new prophylactic methods is demanded, being the use of probiotics a promising alternative (Verschuere et al. 2000).

We have isolated a bacterium from skin mucus of healthy gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.), identified as *S. putrefaciens* Pdp11 (Díaz-Rosales et al. 2009), which has been studied for its application as probiotic in the Senegalese sole and gilthead seabream farming. *S. putrefaciens* has been reported as an important spoilage microorganism of low-temperature store marine seafood (Vogel et al. 2005). However, *Shewanella* species have been also isolated from marine fish such as cod and flounder (Satomi et al. 2006, 2007) representing one of the most frequent cultivable bacterial group isolated from intestines of

specimens of Senegalese sole fed with live prey (Martín-Antonio et al. 2007). Therefore, some strains of this genus has been evaluated as probiotic microorganisms for the culture of farmed fish (Makridis et al. 2005, 2008; Sáenz de Rodríguez et al. 2009; García de la Banda et al. 2010a). In this manuscript, we go through the potential modes of action of this probiotic microorganism, and its effects on different aspects related with the culture of Senegalese sole and gilthead seabream.

Modes of probiotic action

Immune response

Different studies have demonstrated that the dietary administration of probiotic stimulates effectively the innate as well as adaptative immune mechanisms of fish (Newaj-Fyzul et al. 2007; Panigrahi et al. 2007; Brunt et al. 2008; Merrifield et al. 2010b, c, d). In this context, the effect of dietary administration of live cells of Pdp11 increased significant respiratory burst activity of Senegalese sole leucocytes after 60 days of feeding, but this effect was not observed in fish fed with diet supplemented with other probiotic *Shewanella* specie, such as *S. baltica* Pdp13 (Díaz-Rosales et al. 2009). On the other hand, heat-inactivated cells of Pdp11 probiotic did not exhibit in vitro a significant immunostimulatory influence on innate immune parameters of gilthead seabream such as, leucocyte peroxidase content and respiratory burst activity of the seabream head-kidney leucocytes (Salinas et al. 2006). However, administration through the diet of heat-inactivated Pdp11 significantly increased phagocytic ability of head-kidney leucocytes of gilthead seabream (Díaz-Rosales et al. 2006).

With regards to probiotic effects on the adaptive immune system, Arijo et al. (2008), demonstrated that administration of live probiotic strains resulted in the expression of cross-reactive antibodies against outer membrane proteins and extracellular products of *V. harveyi*. A similar effect has also been observed for Pdp11, which presented cross-reactions against specific antibodies synthesized by Senegalese sole specimens against *P. damsela* subsp. *piscicida* (García-Millán et al. 2009). This fact suggests that the administration of probiotics to fish could give some level of cross-protection against pathogenic microorganisms.

Effect on gastrointestinal tract

The histological effect of different probiotics on the intestine has been assessed in vitro (Ringø et al. 2007a, 2010; Salinas et al. 2008a). Our group demonstrated that dietary administration of Pdp11 reduced the high number of big lipid inclusions inside of the enterocytes frequently observed in Senegalese sole specimens receiving a control diet (Fig. 1) (Sáenz de Rodríguez et al. 2009; García de la Banda et al. 2010a). The presence of these inclusions within these cells is normal during the digestive process, but an excessive accumulation of lipids, due to an imbalance between absorption of lipids and synthesis of lipoproteins, may result in functional alterations of enterocytes (Olsen et al. 2000). Species of *Vibrio* and *Shewanella* genera have demonstrated in vitro non-specific lipolytic activity on fish oils containing high levels of n-3 PUFAS (Ando et al. 1991), and it could be an alternative source of lipolytic enzymes and increase the ability of absorption of lipids avoiding the enterocyte damage (Olsen et al. 1999, 2000). In addition microvilli of specimens receiving diet supplement with Pdp11 also seemed to be longer and more numerous with normal apical borders (Fig. 1) (Sáenz de Rodríguez et al. 2009). These

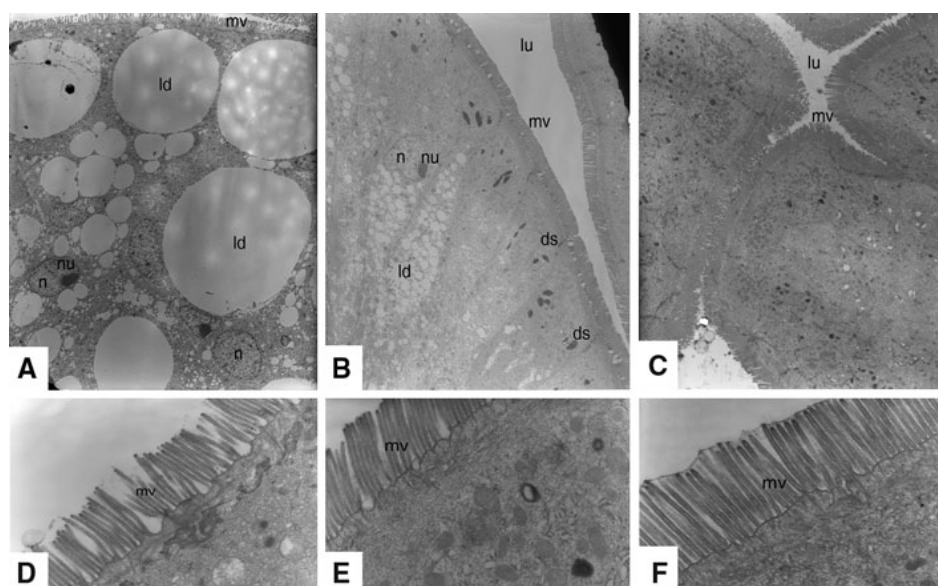


Fig. 1 Enterocytes of proximal intestine of Senegalese sole receiving the control diet (**a, d**), and diets supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 (**b, c**) and *S. baltica* Pdp13 (**c, f**). (*mv*): microvilli, (*ld*): lipid droplet, (*n*): nuclei, (*lu*): lumen, (*ds*): desmosome. Magnification of **a, b** and **c** ($\times 2,500$). Magnification of **d, e** and **f** ($\times 16,000$). This figure was published in the journal *Aquaculture Nutrition* 15:177–185 (2009)

results agree with data reported by Merrifield et al. (2010e), who observed longer microvilli in the proximal intestine of rainbow trout fed with probiotics, in comparison with fish belonging to the control group. All these results obtained in Senegalese sole could suggest a better functionality of enterocytes due to Pdp11 administration.

The teleostean intestinal microbiota play an important role as a defensive barrier against enteric infections (RingØ et al. 2005, 2010; Sundh et al. 2010), and it can regulate the expression of a great amount of genes in the digestive tract, controlling epithelial proliferation, promotion of nutrient metabolism, and innate immune response (Rawls et al. 2004; Bates et al. 2006). For this reason, it is very important to determine the effects of different factors on the intestinal microbiota, such as the presence of probiotic microorganisms in the digestive tract. *Shewanella* genus has been identified as one of the most frequent cultivable bacterial group isolated from intestines of specimens of Senegalese sole fed with live prey (Martín-Antonio et al. 2007), and some strains of this genus have been evaluated as probiotic microorganisms for the culture of farmed fish (Makridis et al. 2005, 2008; Sáenz de Rodrigáñez et al. 2009).

Different authors have reported that the intake of probiotics modified intestinal microbiota composition (Gómez and Balcácar 2008; Merrifield et al. 2010b). This composition has been evaluated especially by methods dependent on culture, resulting in a partial picture of the bacterial community living in fish intestine (Skrodenyte-Arbaciauskiene et al. 2006; Wu et al. 2010). An alternative to overcome this disadvantage is to study the composition of intestinal microbiota by the application of PCR-Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (PCR-DGGE) technique (Uchii et al. 2006; Brunvold et al. 2007; Schneider et al. 2007; He et al. 2009). This methodology analyses the 16S rDNA, giving a whole picture of different species present in the bacterial community. The dietary administration of Pdp11 to Senegalese sole specimens resulted in higher similarity values

for intestinal microbiota among the individuals fed with the probiotic diet than those receiving a control diet (Tapia-Paniagua et al. 2010). These results suggest that the addition of this probiotic could exert a faster stabilization of intestinal bacterial community, increasing predominant band numbers corresponding to *Shewanella* and *Vibrio* genera (Tapia-Paniagua et al. 2009, 2010). Previously, several authors have reported that *Vibrio* genus is the predominant cultivable bacterial group in the intestine of flat fish (Eddy and Jones 2002; Sugita and Ito 2006; Martín-Antonio et al. 2007). It has been suggested that the stabilization of intestinal microbiota by selected probiotic strains could be beneficial to homeostasis of the intestinal microbiota (Kubota et al. 2009). In this way Pdp11 administration could also enhanced this intestinal homeostasis in Senegalese sole.

Effects on nutrition

The microbial modulation and improved morphology of the gastrointestinal tract exerted by probiotics may help to enhance the nutrition of the host (see section “[Effect on gastrointestinal tract](#)”; Merrifield et al. 2010a). This effect can be mediated by enhancement of enzymatic activity (de Schrijver and Ollevier 2000; El-Haroun et al. 2006; Waché et al. 2006) as well as intestinal maturation (Tovar-Ramirez et al. 2004). Thus, probiotics should improve the whole digestive process enhancing feed digestibility of feed and thereby nutritive utilization of feeds (Lin et al. 2004; Burr et al. 2005). Different studies have reported that the application of probiotics increases feed conversion, growth rates and weight gain of fish (Taoka et al. 2006a; Wang et al. 2008). In addition, there are data suggesting that probiotics, such as *Pediococcus acidolactici*, could decreased vertebral column problems in rainbow trout improving bone formation/mineralization via enhanced mineral uptake (Merrifield et al. 2010d, e). Our results have shown that diets supplemented with Pdp11 promoted higher growth of larval and juvenile Senegalese sole specimens compared to non-supplemented diets, and increased muscle protein content, suggesting that the addition of probiotic enhances growth performance (García de la Banda et al. 2009, 2010a; Sáenz de Rodríguez et al. 2009; Lobo et al. 2010). In addition, group receiving probiotic Pdp11 decreased size dispersion respect to control group (García de la Banda et al. 2010a). Similar biometric and metabolic results has been obtained in gilthead seabream, species where probiotic Pdp11 was isolated, indicating that dietary administration of this probiotic also promotes growth in others species different to Senegalese sole (Varela et al. 2010). Moreover, Senegalese sole specimens receiving diets supplemented with Pdp11 increased leucine aminopeptidase activity in the distal intestine respect to fish fed with control diet (Sáenz de Rodríguez et al. 2009). All these results suggested an enhancement of intestine functionality, with the subsequent more efficiently feed utilization in specimens fed with diet supplemented with the probiotic Pdp11. This suggestion was based on the growth trial and enterocytes structure described previously (see “[Effect on gastrointestinal tract](#)”).

During the last few decades there has been a trend in commercial fish feed formulations to increase dietary lipid levels in order to enhance mainly the protein-sparing effect and to improve growth performances as well as production. However, in fish the use of high-energy diets is known to have a direct influence, depending on species and age, on the fat deposition in different organs, being the liver the main target for this deposition (Regost et al. 2001). This organ fulfils numerous functions involved in metabolism, detoxification, digestion or excretion. Lipid assimilation, as well as glycogen and fat supply management are essential roles played by the organ. According to the principle of the relationship, and mutual interaction, between structure and function, an altered liver structure may be

expected to also imply a missfunction. So, a fatty liver characterized by a high fat deposition can be the consequence of: (1) an imbalanced diet (Caballero et al. 1999; Salas-Leiton et al. 2010), (2) a deficiency in dietary fatty acids (Ibeas et al. 1996), (3) problems with lipid peroxidation (Bell et al. 1995) or (4) an inadequate culture conditions (Blanchard et al. 2008). Our group has demonstrated that the inclusion of Pdp11 in the diet decreased significantly number and size of lipid droplets in Senegalese sole hepatocytes (García de la Banda et al. 2010a). These results indicated that inclusion of Pdp11 enhanced liver structure and consequently also function.

In addition the supplementation of diet with lyophilized cells of Pdp11 increased significantly liver linolenic and linoleic acids levels compared to those specimens receiving control diet or supplemented with lyophilized probiotic cells (García de la Banda et al. 2010a). Linoleic acid is involved in the synthesis of important molecules, such as triglycerids and lipoproteins (Sire and Bernier 1981), and making easier the mobilisation of fatty acids from liver, which could be related with the lower fat liver observed in fish feed with the diet supplemented with Pdp11. Therefore, linolenic acid is essential for the regulation of the immune system as well as for its correct development (Calder and Kew 2002; Harbige 2003; Ramirez-Santana et al. 2009).

In the last years, due to the increase in worldwide demand of fish oil, there is a great interest in the inclusion of vegetable oils as partial substitutes for marine ones (Sánchez-Lozano et al. 2007; Wassef et al. 2009). However, the use of these vegetable oils may lead to an imbalance in the type and amount of fatty acids in the commercial feed, producing alterations of lipid absorption and even an increased risk of microbial infection (Caballero et al. 2003). Considering the probiotic Pdp11 effects on reducing lipid deposition in liver (present section) and intestine (section “Effect on gastrointestinal tract”) of Senegalese sole specimens, the diet containing this probiotic could be considered as a suitable supplement to vegetable oils addition to commercial fish diets (García de la Banda et al. 2010a).

Disease resistance

Different bacterial and viral pathogens have been demonstrated to affect Senegalese sole (Table 1). With regard to viral diseases, the potential for probiotic application to improve resistance of Senegalese sole specimens against viral infections is not known yet. In the last years, it has been demonstrated that the use of probiotics or some microorganisms conferred protection against viruses such as, infectious hematopoietic necrosis (IHNV) (Sealey et al. 2007) and influenza (Kawase et al. 2010). If probiotic Pdp11 is able to enhance the immune status of fish, it could be speculated that it might reduce the susceptibility to viral infections. However, further studies are necessary to test this hypothesis.

Several studies have reported the ability of bacterial strains to show in vitro antagonistic activity against fish pathogens, and this is used as a common method to screen for candidate probiotics. These antagonism tests are based on the production of inhibitory compounds or on competition for nutrients (Hjelm et al. 2004; Makridis et al. 2005, 2008). Bacterial pathogens can enter fish by different routes (i.e. skin, gills and gastrointestinal tract) (RingØ et al. 2007a, b; Birkbeck and RingØ 2005), being the mucosal adhesion a critical step in infections by pathogenic bacteria (Namba et al. 2007). For this reason, the mucosa adhesion ability is considered an important criterion for probiotic selection, due to the competition between bacteria and probiotic for mucose adhesion (Vine et al. 2004a, b, 2006).

Table 1 Bacterial and viral diseases reported to Senegalese sole (*Solea senegalensis*)

	Causative agent	Reference
Bacterial diseases		
Pseudotuberculosis	<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	Zorrilla et al. (1999)
Vibriosis	<i>Vibrio harveyi</i>	Zorrilla et al. (2003)
	<i>V. parahaemolyticus</i>	Zorrilla et al. (2003)
Tenacibacteriosis	<i>Tenacibaculum maritimus</i>	Cepeda and Santos (2002) Avendaño-Herrera et al. (2005)
	<i>T. discolor</i>	Pineiro-Vidal et al. (2008a)
	<i>T. gallicum</i>	Pineiro-Vidal et al. (2008a)
	<i>T. soleae</i>	Pineiro-Vidal et al. (2008b)
Viral diseases		
Lymphocystis	Lymphocystis virus	Alonso et al. (2005) Cano et al. (2010)
	Birnaviruses	Rodriguez et al. (1997)
	Betonaviruses	Cutrín et al. (2007)
		Olveira et al. (2008)

The results obtained demonstrated that Pdp11 inhibited the in vitro growth of *P. damsela* subsp. *piscicida* (Chabrállón et al. 2005a) and some virulent strains of *V. harveyi*, *V. alginolyticus* and *V. anguillarum* (Chabrállón et al. 2005a, b, 2006). The in vitro attachment to skin and intestinal mucus of *P. damsela* subsp. *piscicida* and *V. harveyi* was also significantly reduced under displacement and exclusion conditions (Chabrállón et al. 2005a, b). The bacterium *P. damsela* subsp. *piscicida* is highly susceptible to radicals generated during respiratory burst (Barnes et al. 1999; Díaz-Rosales et al. 2009). It has been reported that supplemented diets with Pdp11 increased significantly sole kidney leucocytes respiratory burst activity after 60 day feeding and when they were challenged with *P. damsela* subsp. *piscicida* (Díaz-Rosales et al. 2009; García de la Banda et al. 2010a). These authors suggested that long-term probiotic treatment could enhance this immunological activity in the phagocytes. In this way, the increase of this immunological ability after Pdp11 treatment could facilitate a more effective destruction of *P. damsela* subsp. *piscicida* and enhances sanitary status of Senegalese sole specimens.

Research aspects in developing

Route of administration of Pdp11

Most of the available probiotic studies report the effects of live cells administered through diet (Salinas et al. 2008b; Vendrell et al. 2008; Merrifield et al. 2010b, c). However, there are studies which have implied the administration of dead and disrupted cells (Irianto et al. 2003; Panigrahi et al. 2005; Taoka et al. 2006b; Newaj-Fyzul et al. 2007), lyophilised cells (Panigrahi et al. 2007; Merrifield et al. 2010d) and cell-free supernatants (Brunt and Austin 2005; Abbas et al. 2010). The administration of probiotics as lyophilised or inactivated cells could be more feasible than the use of live cells at the aquaculture industry. However, Panigrahi et al. (2005) have reported that live cells used as probiotic induced better results than inactivated cells. In this context, the positive effect exerted by Pdp11 regard to growth

and disease resistance were derived from the experiments supplementing the diets with lyophilised (Díaz-Rosales et al. 2009; Sáenz de Rodrigáñez et al. 2009; García de la Banda et al. 2010a, b; Varela et al. 2010), heat-inactivated (Díaz-Rosales et al. 2006; Salinas et al. 2006) and fresh cells (García de la Banda et al. 2010b). In addition, Tapia-Paniagua et al. (2010) determined the diversity of the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole after the administration of diets supplemented with fresh and lyophilised cells of Pdp11. The authors concluded that the use of fresh cells enhanced significantly intragroup similarity indices of the intestinal microbiota than those observed in fish receiving a diet control. In addition, the diet supplemented with fresh Pdp11 cells, but not lyophilised, conferred protection against *P. damsela* subsp. *piscicida* (García de la Banda et al. 2010b). These results suggested that the addition of fresh probiotic cells could exert an important influence on bacterial intestinal groups and yield a faster estabilization of bacterial community (Tapia-Paniagua et al. 2010).

Encapsulation

In order to confer benefits to the host it is desirable that probiotics are viable at high concentrations when reaching the gut (Panigrahi et al. 2005). These microorganisms must survive to the stress factors encountered in the gastrointestinal tract, such as the acidic conditions of the stomach, digestive enzymes and bile salts (Marteau et al. 2001). In addition, technological processing such as the incorporation into fish feed and storage conditions is detrimental to the viability of probiotics (Rosas-Ledesma et al. 2009). For all these reasons, encapsulation or immobilization need ensure the survival of probiotic bacteria both in foods and gastrointestinal environment (Rao et al. 1989). Several methods for making microencapsulated bacteria have been developed. Among the available techniques for immobilizing living cells, entrapment in calcium alginate beads has been frequently used with lactic acid bacteria (Guérin et al. 2003; Sheu and Marshall 1993). Alginate presents the benefits of being non-toxic to the immobilized cells and it is an accepted food additive. However, a careful selection of processing conditions is essential to achieve high survival of the encapsulated bacteria as well as high efficiency of encapsulation (Lee and Heo 2000). Results obtained indicate that Pdp11 can be successfully encapsulated in calcium alginate beads, with percentages of encapsulated cells always above 80% (Rosas-Ledesma et al. 2009). This probiotic is inactivated by acid pH values, but its encapsulation in alginate beads protects the bacteria from crude digestive extracts obtained from Senegalese sole at acid pH values. Thus, encapsulation in alginate beads confers the bacteria resistance to low pH; and further dissolution at neutral pH should allow these particles to deliver the probiotic to the intestine without damage (Moriñigo et al. 2008; Sánchez et al. 2008). In addition, alginate capsules containing viable Pdp11 can be stored at 4°C for at least 1 month, showing a survival of encapsulated probiotic above 90%. On the contrary, storage of the capsules at 22°C resulted in a loss of 40% of probiotic viability within 30 days (Rosas-Ledesma et al. 2009). This is a clear advantage for fish farmers because as well to increase the survival of the probiotic microorganism during the storage, it makes easier the incorporation of fresh cells to the feed.

Stress

The aquaculture environment results in a continuous exposition of fish to repeated acute stress, which has suppressive effects on physiology of fish (Wendelaar Bonga 1997; Barton 2002). In the last years several evidences have demonstrated a beneficial effect of probiotic

administration on stress response. So, the commercial probiotic Alchem Poseidon® (containing a mix of *Bacillus subtilis*, *Lactobacillus acidophilus*, *Clostridium butyricum* and *Saccharomyces cerevisiae*) increased stress tolerance of Japanese flounder, *Paralichthys olivaceus*, maintained in a closed recirculating system (Taoka et al. 2006a). Lactic acid bacteria, such as *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *delbrueckii* and *Lactobacillus rhamnosus* improved growth and have been demonstrated as stress modulators decreasing cortisol levels in seabass *Dicentrarchus labrax* (Carnevali et al. 2006), and improving metabolic, nutrient and enzymatic conditions in *Oreochromis niloticus* (Gonçalves et al. 2010). In gilthead seabream also two lactic acid bacteria (*Lactobacillus fructivorans* and *Lactobacillus plantarum*) avoid the increase of cortisol levels in specimens submitted to acute stress situation (Rollo et al. 2006). Therefore, the commercial probiotic Efinol® enhanced survival and decreased cortisol levels during transportation of Amazonian ornamental fishes (Gomes et al. 2009). In this context, the dietary administration of the probiotic Pdp 11 improved stress tolerance of juvenile gilthead seabream to high stocking density, suggesting that the use of this probiotic can be beneficial for aquaculture activity of this species (Varela et al. 2010).

It could be very interesting to prepare fish in advance, by treatment with probiotics, on critical situations susceptible to stimulate stress system (i. e. as transport, changing temperatures, periodic manipulation or other stressful situation). According to this idea, the use of Pdp11 to avoid deleterious high stress response due to conventional aquaculture practices (i.e. high density, manipulation, etc.) is being test in Senegalese sole and gilthead seabream.

Future perspectives

The decision of using probiotics in aquaculture has been in large part a result of empirical use and not based on scientific criteria. Nowadays, there is a higher knowledge of the modes of action of the probiotics, but more information on the probiotic-host interaction is needed for a better understanding of the real effect of the probiotics. In this context, the data and results obtained from the studies carried out have shown that the use of Pdp11 as probiotic microorganism in the culture of farmed fish, such as Senegalese sole and gilthead seabream can be effective. However, several aspects might be considered for future researches, such as the dose, use combined with prebiotics and other probiotic species, effects on the proteomic and genomic expression of host and in vivo interactions with pathogenic microorganisms.

Acknowledgments The authors are grateful for the financial support of the *Ministerio Español de Ciencia y Tecnología* (AGL2002-01488, AGL2005-07454-CO2-O2, AGL2008-05119-CO2-01, AGL2008-05119-CO2-02 and PET2006 0104 00), Spanish National Development Plan for Sole Farming (JACUMAR), and *Fundación Séneca* of Murcia, Spain (04538/GERM/06). S. Tapia-Paniagua and P. Díaz-Rosales wish to thank the *Spanish Government* for an F.P.U. scholarship. Authors also thank PROMAN (Motril, Granada, Spain) and Planta de Cultivos Marinos del Centro Andaluz de Estudios Marinos (CA.S.E.M., Universidad de Cádiz) for help and supply of fish as well as use of experimental tanks. The authors thank to publisher John Wiley and Sons by the license to use one of the figures published in the journal *Aquaculture Nutrition* 15:177-185 (2009).

References

- Abbas A, Sharifuzzaman SM, Austin B (2010) Cellular components of probiotics control *Yersinia ruckeri* infection in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 33:31–37
- Akinbowale OL, Peng H, Barton MD (2006) Antimicrobial resistance in bacteria isolated from aquaculture sources in Australia. *J Appl Microbiol* 100:1103–1113

- Alonso MC, Cano I, García-Rosado E et al (2005) Isolation of lymphocystis disease virus from sole, *Solea senegalensis* Kaup, and blackspot seabream, *Pagellus bogaraveo* (Brünnich). J Fish Dis 28:221–228
- Ando S, Yoshida A, Hatano M (1991) Occurrence of marine bacterial lipase hydrolyzing fish oil. Agric Biol Chem 55:2657–2659
- Arijo S, Chabrilón M, Díaz-Rosales P et al (2005a) Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). Bull Eur Ass Fish Pathol 25:148–154
- Arijo S, Rico R, Chabrilón M et al (2005b) Effectiveness of a divalent vaccine for sole, *Solea senegalensis* (Kaup), against *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. J Fish Dis 28:33–38
- Arijo S, Brunt J, Chabrilón M et al (2008) Subcellular components of *Vibrio harveyi* and probiotics induce immune responses in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum), against *V. harveyi*. J Fish Dis 31:579–590
- Avendaño-Herrera R, Magariños B, Moriño MA et al (2005) A novel O-serotype in *Tenacibaculum maritimum* strains isolated from cultured sole (*Solea senegalensis*). Bull Eur Ass Fish Pathol 25:70–74
- Balcázar JL, de Blas I, Ruíz-Zarzuela I et al (2006) The role of probiotics in aquaculture. Vet Microbiol 114:173–186
- Barnes AC, Balebona MC, Horne MT et al (1999) Superoxide dismutase and catalase in *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and their roles in resistance to reactive oxygen species. Microbiology 145:483–494
- Barton BA (2002) Stress in fishes: a diversity of responses with particular reference to changes in circulating corticosteroids. Integr Comp Biol 42:517–525
- Bates JM, Mitte E, Kuhlman J et al (2006) Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation. Dev Biol 297:374–386
- Bell JG, Tocher DR, MacDonald M et al (1995) Effects of dietary borage oil (enriched in α -linoleic acid, 18:3(n-6)) or marine fish oil (enriched in eicosapentaenoic acid, 20:5(n-3)) on growth, mortalities, liver histopathology and lipid composition of juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*). Fish Physiol Biochem 14:373–383
- Birkbeck TH, Ringø E (2005) Pathogenesis and the gastrointestinal tract of growing fish. In: Holzapfel W, Naughton P (eds) Microbial ecology in growing animal. Elsevier, Edinburgh
- Blanchard G, Gardeur JN, Mathis N et al (2008) Ultrastructural features of hepatocytes in cultured Eurasian perch (*Perca fluviatilis* L.) as affected by nutritional and husbandry conditions. Br J Nutr 100:317–331
- Brunt J, Austin B (2005) Use of a probiotic to control lactococcosis and streptococcosis in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). J Fish Dis 28:693–701
- Brunt J, Hansen R, Jamieson DJ et al (2008) Proteomic analysis of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) serum after administration of probiotics in diets. Vet Immunol Immunopathol 121:199–205
- Brunvold L, Sandaa RA, Mikkelsen H et al (2007) Characterisation of bacterial communities associated with early stages on intensively reared cod (*Gadus morhua*) using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Aquaculture 272:319–327
- Burr G, Hatlin D, Ricke S (2005) Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of prebiotics and probiotics in fin fish aquaculture. J World Aquac Soc 36:425–436
- Caballero MJ, López-Calero G, Socorro J et al (1999) Combined effect of lipid level and fish meal quality on liver histology of gilthead seabream (*Sparus aurata*). Aquaculture 179:277–290
- Caballero MJ, Izquierdo MS, Kjorsvik E et al (2003) Morphological aspects of intestinal cells from gilthead seabream (*Sparus aurata*) fed diets containing different lipid sources. Aquaculture 225:325–340
- Calder PC, Kew S (2002) The immune system: a target for functional foods? Brit J Nutr 88:S165–S176
- Cano I, Valverde EJ, López-Jimena B et al (2010) A new genotype of *Lymphocytivirus* isolated from cultured gilthead seabream, *Sparus aurata* L., and Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). J Fish Dis 33:695–700
- Carnevali O, de Vivo L, Sulpizio R et al (2006) Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. Aquaculture 258:430–438
- Cepeda C, Santos Y (2002) First isolation of *Flexibacter maritimus* from farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) in Spain. Bull Eur Ass Fish Pathol 22:388–392
- Chabrilón M, Rico S, Balebona MC et al (2005a) Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. J Fish Dis 28:229–237
- Chabrilón M, Rico RM, Arijo S et al (2005b) Interactions of microorganisms isolated from gilthead seabream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). J Fish Dis 28:531–537

- Chabrilón M, Arijó S, Díaz-Rosales P et al (2006) Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) Aquaculture Res 37: 78–86
- Cutrín JM, Dopazo CP, Thiéry R, Leao P, Oliveira JG, Barja JL, Bandín I (2007) Emergence of pathogenic betanodaviruses belonging to the SJNNV genogroup in farmed fish species from the Iberian Peninsula. J Fish Dis 30:225–232
- de Schrijver R, Ollevier F (2000) Protein digestion in juvenile turbot (*Scophthalmus maximus*) and effects of dietary administration of *Vibrio proteolyticus*. Aquaculture 186:107–116
- Díaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A et al (2006) Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response after dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. Fish Shellfish Immunol 20:482–492
- Díaz-Rosales P, Arijó S, Chabrilón M et al (2009) Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquaculture 293:16–21
- Eddy SD, Jones SH (2002) Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. Aquaculture 211:9–28
- El-Haroun ER, Goda AMAS, Kabir Chowdhury MA (2006) Effect of dietary probiotic biogen® supplementation as a growth promoter on growth performance and feed utilization of Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. Aquac Res 37:1473–1480
- Farzanfar A (2006) The use of probiotics in shrimp aquaculture FEMS. Immunol Med Microbiol 48: 149–158
- Food and Agriculture Organization of the United Nations (2010) Aquaculture planning. Policy formulation and implementation of sustainable development. FAO Fisheries and Aquaculture Technical Paper 542. Rome
- Fuller R (1989) Probiotics in man and animals. J Appl Bacteriol 66:365–378
- García de la Banda I, Lobo C, Martín I et al (2009) Enhancement of larval and postlarval Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) culture by *Shewanella* Pdp11 probiotic addition. In: Abstracts of Aquaculture Europe 09, Trondheim, 14–17 August 2009
- García de la Banda I, Lobo C, León-Rubio JM et al (2010a) Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquaculture 306:281–288
- García de la Banda I, Lobo C, Lucas ML et al (2010b) Influence of different ways of administration (fresh and lyophilized) of Pdp11 *Shewanella putrefaciens* on growth and performance of sole juveniles (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858). In: Abstracts of aquaculture Europe 10, Oporto, 5–8 October 2010
- García-Millán I, León-Rubio JM, Rosas-Ledesma P et al (2009) Detection of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* proteins involved in the specific immune response of sole (*Solea senegalensis*) and cross reactivity with probiotics. In: Abstracts of 14th international conference of European association of fish pathologists. Prague 14–19 September
- Gatesoupe FJ (1999) The use of probiotics in aquaculture. Aquaculture 180:147–165
- Gomes LC, Brinn RP, Marcon JL et al (2009) Benefits of using the probiotic Efinol®L during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz), in the Amazon. Aquac Res 40:157–165
- Gómez GD, Balcázar JL (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. FEMS Immunol Med Microbiol 52:145–154
- Gonçalves A, Maita M, Katagiri T et al (2010) Probiotic bacteria as therapeutic agent against stress and the efficiency of blood clinical biochemistry model to assess stress physiological state Abstracts of Aquaculture Europe 10, Oporto, 5–8 October 2010
- Guérin D, Vuilleumard JC, Subirade M (2003) Protection of bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. J Food Prot 66:2076–2084
- Harbige LS (2003) Fatty acids, the immune response, and autoimmunity: a question of n-6 essentiality and the balance between n-6 and n-3. Lipids 38:323–341
- He S, Zhou Z, Liu Y et al (2009) Effects of dietary *Saccharomyces cerevisiae* fermentation product (DVAQUA®) on growth performance, intestinal autochthonous bacterial community and non-specific immunity of hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *O. aureus* ♂) cultured in cages. Aquaculture 294:99–107
- Hjelm M, Bergh O, Riaz A et al (2004) Selection and identification of autochthonous potential probiotic bacteria from turbot larvae (*Scophthalmus maximus*) rearing units. Syst Appl Microbiol 27:360–371
- Ibeas C, Cejas J, Gómez T et al (1996) Influence of dietary n-3 highly unsaturated fatty acids levels on juvenile gilthead seabream (*Sparus aurata*) growth and tissue fatty acid composition. Aquaculture 142:221–235

- Imsland AK, Foss A, Conceição LEC, Dinis MT, Delbare D, Schram E, Kamstra A, Rema P, White P (2003) A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. Rev Fish Biol Fish 13:379–407
- Irianto A, Austin B (2002) Probiotics in aquaculture. J Fish Dis 25:633–642
- Irianto A, Robertson PAW, Austin B (2003) Oral administration of formalin-inactivated cells of *Aeromonas hydrophila* A3–51 controls infection by atypical *A. salmonicida* in goldfish, *Carassius auratus* (L.). J Fish Dis 26:117–120
- Kawase M, He F, Kubota A et al (2010) Oral administration of lactobacilli from human intestinal tract protects mice against influenza virus infection. Lett Appl Microbiol 51:6–10
- Kesarcodi-Watson A, Kaspar H, Lategan MJ et al (2008) Probiotics in aquaculture: the need, principles and mechanisms of action and screening processes. Aquaculture 274:1–24
- Kubota A, He F, Kawase M et al (2009) *Lactobacillus* strains stabilize intestinal microbiota in Japanese cedar pollionis patients. Microbiol Immunol 53:198–205
- Lee KY, Heo TR (2000) Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. Appl Environ Microbiol 66:869–873
- Lin HZ, Guo Z, Yang Y et al (2004) Effect of dietary probiotics on apparent digestibility coefficients of nutrients of white shrimp *Litopenaeus vannamei* Boone. Aquaculture 35:1441–1447
- Lobo C, García de la Banda I, León-Rubio JM et al (2010) Pdp11 *Shewanella* probiotic addition on larval senegal sole *Solea senegalensis* (Kaup) culture Abstracts of Aquaculture Europe 10, Oporto, 5–8 October 2010
- Makridis P, Martins S, Vercauteren T et al (2005) Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead seabream larvae (*Sparus aurata*) using an in vivo approach. Lett Appl Microbiol 40:274–277
- Makridis P, Martins S, Reis J et al (2008) Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquac Res 39:627–634
- Marteau PR, deVrese M, Cellier CJ et al (2001) Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. Am J Clin Nutr 20:41–45
- Martín-Antonio B, Manchado M, Infante C et al (2007) Intestines microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. Aquac Res 38:1213–1222
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A et al (2010a) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 320:1–18
- Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM et al (2010b) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) I. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria. Aquac Nutr 16:504–510
- Merrifield DL, Bradley G, Baker RTM et al (2010c) Probiotic applications for rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum) II. Effects on growth performance, feed utilisation, intestinal microbiota and related health criteria post antibiotic treatment. Aquac Nutr 16:496–503
- Merrifield DL, Harper G, Baker RTM et al (2010d) Possible influence of probiotic adhesion to intestinal mucosa on the activity and morphology of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) enterocytes. Aquac Res 41:1268–1272
- Merrifield DL, Bradley G, Harper GM et al (2010e) Assessment of the effects of vegetative and lyophilised *Pediococcus acidilactici* on growth, feed utilisation, intestinal colonisation and health parameters of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquacult Nutr in press. doi:10.1111/j.1365-2095.2009.00712.x
- Moriño MA, Sánchez V, Martínez TF et al (2008) Encapsulation of a bacterial fish probiotic in alginate beads: protective effect under in vitro simulations of fish gastric conditions. In: Abstracts of the international conference on fish diseases and fish immunology. University of Iceland, Reykjavik, 6–9 September 2008
- Namba A, Mano N, Hirose H (2007) Phylogenetic analysis of intestinal bacteria and their adhesive capability in relation to the intestinal mucus of carp. J Appl Microbiol 102:1307–1317
- Newaj-Fyzul A, Adesiyunz AA, Mutani A et al (2007) *Bacillus subtilis* AB1 controls *Aeromonas* infection in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum). J Appl Microbiol 103:1699–1706
- Olsen RE, Myklebust R, Kaino T et al (1999) Lipid digestibility and ultrastructural changes in the enterocytes of Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.) fed linseed oil and soybean lecithin. Fish Physiol Biochem 21:35–44
- Olsen RE, Myklebust R, Ringø E, Mayhew TM (2000) The influence of dietary linseed oil and saturated fatty acids on caecal enterocytes in Arctic char (*Salvelinus alpinus* L.): a quantitative ultrastructural study. Fish Physiol Biochem 22:207–216
- Olveira JG, Soares F, Engrola S, Dopazo CP, Bandín I (2008) Antemortem versus post-mortem methods for detection of betanodavirus in Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J Vet Diagn Invest 20:215–219
- Panigrahi A, Kiron V, Puangkaew J et al (2005) The viability of probiotic bacteria as a factor influencing the immune response in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss*. Aquaculture 243:241–254

- Panigrahi A, Kiron V, Satoh S et al (2007) Immune modulation and expression of cytokine genes in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* upon probiotic feeding. *Dev Comp Immunol* 31:372–382
- Pineiro-Vidal M, Centeno-Sestelo G, Riaza A, Santos Y (2007) *Tenacibaculum maritimum*-related organisms from diseased turbot and sole cultured in the Northwest of Spain. *Bull Eur Ass Fish Pathol* 27:29–35
- Pineiro-Vidal M, Riaza A, Santos Y (2008a) *Tenacibaculum discolor* sp. nov. and *Tenacibaculum gallicum* sp. nov., isolated from sole (*Solea senegalensis*) and turbot (*Psetta maxima*) culture systems. *Int J Syst Evol Microbiol* 58:21–25
- Pineiro-Vidal M, Carballas CG, Gómez-Barreiro O et al (2008b) *Tenacibaculum soleae* sp. nov., isolated from diseased sole (*Solea senegalensis* Kaup). *Int J Syst Evol Microbiol* 58:881–885
- Ramirez-Santana C, Castellote C, Castell M et al (2009) Long-term feeding of the cis-9, trans-11 isomer of conjugated linoleic acid reinforces the specific immune response in rats. *J Nutr* 139:76–81
- Rao AV, Shiwonarain N, Maharaj J (1989) Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. *Can Inst Food Sci Technol J* 22:345–349
- Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:4596–4601
- Regost C, Arzel J, Cardinal M et al (2001) Dietary lipid level, hepatic lipogenesis and flesh quality in turbot (*Psetta maxima*). *Aquaculture* 193:291–309
- Ringø E, Schillinger U, Holzapfel W (2005) Antibacterial abilities of lactic acid bacteria isolated from aquatic animals and the use of lactic acid bacteria in aquaculture. In: Holzapfel W, Naughton P (eds) *Microbial ecology in growing animals*. Elsevier, Edinburgh
- Ringø E, Salinas I, Olsen RE et al (2007a) Histological changes in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) intestine following in vitro exposure to pathogenic and probiotic bacterial strains. *Cell Tissue Res* 328:109–116
- Ringø E, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE (2007b) Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268:251–264
- Ringø E, Løvmo L, Kristiansen M et al (2010) Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac Res* 41:451–467
- Rodríguez S, Vilas P, Sarasquete C et al (1997) Isolation and preliminary characterization of a birnavirus from *Solea senegalensis* in southwestern Spain. *J Aquat Anim Health* 9:295–300
- Rollo A, Sulpizi R, Nardi M et al (2006) Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiol Biochem* 32:167–177
- Romalde JL (2002) *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*: an integrated review of a bacterial fish pathogen. *Int Microbiol* 5:3–9
- Rosas-Ledesma P, León-Rubio JM, Martínez-Manzanares E, Balebona MC (2009) Evaluation of the survival of a probiotic bacteria in the gastrointestinal tract of *Solea senegalensis* using a red fluorescent protein labelled strains. *Aquaculture Europe* 09, Trondheim, 14–17 August 2009
- Sáenz de Rodrigáñez MA, Díaz-Rosales P, Chabrillón M et al (2009) Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Sole senegalensis*, Kaup 1858). *Aquac Nutr* 15:177–185
- Salas-Leiton E, Asensio E, Rodríguez-Rúa A et al (2010) Effect of dietary free fatty acid content on growth and hepatic morphology in sole (*Solea senegalensis*) juveniles Abstracts of Aquaculture Europe 10, Oporto, 5–8 October 2010
- Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A et al (2006) Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet Immunol Immunopathol* 111:279–286
- Salinas I, Myklebust R, Esteban MA et al (2008a) In vitro studies of *Lactobacillus delbruekii* subsp. *lactis* in atlantic salmon (*Salmo salar*) foregut: tissue responses and evidence of protection against *Aeromonas salmonicida* subsp. *salmonicida* epithelial damage. *Vet Microbiol* 128:167–177
- Salinas I, Abelli L, Bertoni F et al (2008b) Monospecies and multispecies probiotic formulations produce different systemic and local immunostimulatory effects in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Fish Shellfish Immunol* 25:114–123
- Sánchez V, Martínez TF, Balebona MC et al (2008) Survival of probiotics encapsulated in alginate beads during exposure to simulated fish digestive conditions. Food science and food biotechnology in developing Countries 3rd international congress FSFB, 3rd international congress, Querétaro, 14–17 October 2008
- Sánchez-Lozano NB, Tomás A, Martínez-Llorens S et al (2007) Growth and economic profit of gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) fed sunflower meal. *Aquaculture* 272:528–534
- Satomi M, Vogel BF, Gram L, Venkateswaran K (2006) *Shewanella putrefaciens* sp. nov. and *Shewanella morhuae* sp. nov., isolated from marine fish of the Baltic Sea. *Int J Syst Evol Microbiol* 56:243–249

- Satomi M, Vogel BF, Venkateswaran K, Gram L (2007) Description of *Shewanella glacialis* sp. nov. and *Shewanella algidipiscicola* sp. nov., isolated from marine fish of the Danish Baltic Sea, and proposal that *Shewanella affinis* is a later heterotypic synonym of *Shewanella colwelliana*. Int J Syst Evol Microbiol 57:347–352
- Schneider O, Chabréillon M, Smidt H et al (2007) HRT and nutrients affect bacterial communities grown on recirculation aquaculture system effluents. FEMS Microbiol Ecol 60:207–219
- Schwarz S, Kehrenberg C, Wals TR (2001) Use of antimicrobial agents in veterinary medicine and food animal production. Int J Antimicrob Agents 17:431–437
- Sealey WM, Barrows FT, Johansen KA et al (2007) Evaluation of the ability of partially autolyzed yeast and gnotobiotic-A to improve disease resistance in rainbow trout. N Am J Aquac 69:400–406
- Sheu TY, Marshall RT (1993) Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. J Food Sci 54:557–561
- Sire MF, Bernier JM (1981) Étude ultrastructurale de la synthèse des chylomicrons au cours de l'absorption intestinale des lipides chez la truite. Influence de la nature des acides gras ingérés. Biol Cell 40:47–62
- Skrodenyte-Arbaciauskiene V, Sruoga A, Butkauskas D (2006) Assessment of microbial diversity in the river trout *Salmo trutta fario* L. intestinal tract identified by partial 16S rRNA gene sequence analysis. Fish Sci 72:597–602
- Spanggaard B, Huber I, Nielsen J et al (2001) The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. Environ Microbiol 3:755–765
- Sugita H, Ito Y (2006) Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. Lett Appl Microbiol 43:336–342
- Sundh H, Kvamme B-O, Fridell F et al (2010) Intestinal barrier function as a welfare indicator of sub-optimal husbandry conditions in Atlantic salmon (*Salmo salar*) aquaculture. Abstracts of Aquaculture Europe 10, Oporto, 5–8 October 2010
- Taoka Y, Maeda H, Jo J et al (2006a) Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. Fish Sci 72:310–321
- Taoka Y, Maeda H, Jo JY et al (2006b) Use of live and dead probiotic cells in *Tilapia oreochromis niloticus*. Fish Sci 72:755–766
- Tapia-Paniagua ST, García de la Banda I, Lobo C et al (2009) Effect of dietary administration of probiotics on intestinal microbiota of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Aquaculture Europe 09, Trondheim, 14–17 August 2009
- Tapia-Paniagua ST, Chabréillon M, Díaz-Rosales P et al (2010) Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup 1858) following probiotic administration. Microb Ecol 60:310–319
- Tovar-Ramirez D, Infante JZ, Cahu C et al (2004) Influence of dietary live yeast on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) larval development. Aquaculture 234:415–427
- Uchii K, Matsui K, Yonekura R et al (2006) Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different feeding habits. Microbiol Ecol 51:277–283
- Varela JL, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L et al (2010) Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. Aquaculture: 265–271
- Vendrell D, Balcázar JL, de Blas I et al (2008) Protection of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) from lactococcosis by probiotic bacteria. Comp Immunol Microb 31:337–345
- Verschuer L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev 64:655–671
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H et al (2004a) Competition for attachment of aquaculture candidate probiotic and pathogenic bacteria on fish intestinal mucus. J Fish Dis 27:319–326
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H (2004b) In vitro growth characteristics of five candidate aquaculture probiotics and two fish pathogens grown in fish intestinal mucus. FEMS Microbiol Lett 231:145–152
- Vine NG, Leukes WD, Kaiser H (2006) Probiotics in marine larviculture. FEMS Microbiol Rev 30:404–427
- Vogel BF, Venkateswaran K, Satomi M, Gram L (2005) Identification of *Shewanella baltica* as the most important H₂S-producing species during iced storage of Danish marine fish. Appl Environ Microbiol 71:6689–6697
- Waché Y, Auffray F, Gatesoupe FJ et al (2006) Cross effects of the strain of dietary *Saccharomyces cerevisiae* and rearing conditions on the onset of intestinal microbiota and digestive enzymes in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, fry. Aquaculture 258:470–478
- Wang Y-B, Tian Z-Q, Yao J-T, Li W-E (2008) Effect of probiotics, *Enterococcus faecium*, on tilapia (*Oreochromis niloticus*) growth performance and immune response. Aquaculture 277:203–207

- Wassef EA, Saleh NE, El-Abd El-Hady HA (2009) Vegetable oil blend as alternative lipid resources in diets for gilthead seabream, *Sparus aurata*. Aquac Int 17:421–435
- Wendelaar Bonga SE (1997) The stress response in fish. Physiol Rev 7:591–625
- Wu S, Gao T, Zheng Y et al (2010) Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*). Aquaculture 303:1–7
- Zorrilla I, Balebona MC, Morínigo MA et al (1999) Isolation and characterization of the causative agent of pasteurellosis, *Photobacterium damsela* ssp *piscicida*, from sole, *Solea senegalensis* (Kaup). J Fish Dis 22:167–172
- Zorrilla I, Arijo S, Chabrilón M et al (2003) *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. J Fish Dis 26:103–108

Microb Ecol (2010) 60:310–319
DOI 10.1007/s00248-010-9680-z

HOST MICROBE INTERACTIONS

Intestinal Microbiota Diversity of the Flat Fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) Following Probiotic Administration

Silvana Teresa Tapia-Paniagua · Mariana Chabrilón · Patricia Díaz-Rosales · Inés García de la Banda · Carmen Lobo · Ma. Carmen Balebona · Miguel Angel Morínigo

Received: 8 September 2009 / Accepted: 22 April 2010 / Published online: 17 June 2010
© Springer Science+Business Media, LLC 2010

Abstract Pleuronectiforms are an important group of fish, and one of their species, *Solea senegalensis* (Kaup 1858), has been extensively studied at different levels, although information about its intestinal microbiota and the effects of different factors on it is very scarce. Modern aquaculture industry demands strategies which help to maintain a microbiologically healthy environment and an environmentally friendly aquaculture. In this context, probiotics seem to offer an attractive alternative. The intake of probiotics could modify the composition of the intestinal microbiota, which is a key component in excluding potential invaders and maintaining health. The aim of this study was to evaluate by 16S rRNA gene analysis using polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis the effect of administering fresh or lyophilized cells of Pdp11 on the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole, using sodium alginate to facilitate the incorporation of bacterial cells to the feed. The results obtained showed that the composition of fish intestinal microbiota was affected when fish received a diet supplemented with sodium

alginate and fresh or lyophilized probiotic cells. In all cases, the dominant bacterial groups belonged to γ -Proteobacteria and mainly the *Vibrio* species. The use of sodium alginate reduced the incidence of populations with <97% 16S rRNA gene sequence identity to uncultured microorganisms in the intestinal microbiota until non-detected limits. On the other hand, the supplementation of the diet with probiotics produced an increase of the predominant species related to *Vibrio* genus.

Introduction

It is generally recognized that the gastrointestinal microbiota of homeothermic animals serve several functions, such as digestion and development of the mucosal system, angiogenesis, and as a protection barrier against disease [45, 47]. [35] have demonstrated that microbiota in fish can regulate the expression of more than 200 genes in the digestive tract controlling epithelial proliferation, the promotion of nutrient metabolism, and innate immune response. Thus, the establishment of a microbiota is a key component in order to promote health by competitive mechanisms and facilitate immune system development and maturation. An important aspect of these results was the specificity of the host response, which depends on the bacterial species colonizing the digestive tract [35]. Therefore, it is relevant to know the composition of this microbiota in fish and the effects which different factors could have on it, especially in the case of farmed fish with high economical interest such as *Solea senegalensis*.

Studies on intestinal microbiota in fish have been focused mainly on the relationships between pathogens and disease control [2, 16, 37, 46]. Few studies have

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00248-010-9680-z) contains supplementary material, which is available to authorized users.

S. T. Tapia-Paniagua · M. Chabrilón · P. Díaz-Rosales · M. C. Balebona · M. A. Morínigo (✉)
Group of Prophylaxis and Biocontrol of Fish Diseases,
Department of Microbiology, Faculty of Sciences,
University of Málaga,
29071 Málaga, Spain
e-mail: morinigo@uma.es

I. G. de la Banda · C. Lobo
Spanish Institute of Oceanography,
C. O. Santander, Promontorio S. Martín s/n., Ap. 240,
39080 Santander, Spain

 Springer

focused on the functional relationships between fish and their intestinal microbiota, although in previous works the role of the intestinal microbiota on the nutrition and digestion of the host has been reported [23, 49]. The bacterial colonization of the intestines of fish begins during the larval period, and during the following stages of development a significant influence on the intestinal microbiota is exerted by factors such as surrounding environment, culture conditions, and feeding [30]. The composition of the intestinal microbiota of fish has been evaluated principally by methods dependent on culture [23, 37], resulting in a partial picture of the bacterial pool living in the fish intestine. The main problem of this kind of studies is that culture techniques are laborious and time consuming, especially if bacterial isolates must be identified. An alternative to overcome these disadvantages consists in studying the composition of intestinal microbiota by the application of molecular methods, such as polymerase chain reaction-denaturing gradient gel electrophoresis (PCR-DGGE) [4, 43, 50]. The DGGE technique is capable of analyzing the 16S rRNA gene, avoiding the culture of the bacteria and giving a whole picture of both the culturable and the non-culturable fraction of the bacterial community. The PCR-DGGE technique has been previously used to evaluate and characterize the bacterial communities in different marine organisms such as sponges [27], farmed fish [4, 25, 26], and crustaceans [33]. The dietary effects on the intestinal microbial profile of species such as chickens [17] and pigs [19] have been also studied, but similar studies for farmed fish have been scarcely reported [40].

The demonstration that the intestinal microbiota is an important component of mucosal barrier has resulted in the promotion of the use of beneficial probiotics [15]. Probiotics have been defined as viable microbial food supplements which have a positive effect on the health of the host. Modern aquaculture industry demands alternative prophylactics which help to maintain a microbiologically healthy environment and an environmentally friendly aquaculture, resulting in better production and higher profits. In this context, probiotics seem to offer an attractive alternative to the use of antibiotics or other chemotherapeutics agents [3, 51]. The intake of probiotics has been demonstrated to modify the composition of the microbiota and assist in returning a disturbed microbiota to its normal healthy composition [15].

In previous studies, we obtained the isolate Pdp11 from the skin of gilthead seabream (*Sparus aurata*), identified as *Shewanella putrefaciens* [11], which was considered as a potential fish probiotic to be tested in farmed Senegalese sole. The way of administering probiotics is also an important factor to be considered since they can be administered as lyophilized [6, 7] or fresh cells [22].

The aim of this study was to determine the diversity of the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole after the administration of two different diets with the probiotic microorganism *S. putrefaciens* Pdp11.

Methods

Microorganisms

The bacterium Pdp11 isolated from the skin of gilthead seabream, previously identified as *S. putrefaciens*, was selected for this study. This isolate showed in vitro interactions with fish pathogens such as *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* and *Vibrio harveyi*, and it was not virulent for Senegalese sole [6, 7]. It was able to modulate the innate immune responses of gilthead seabream and Senegalese sole [11, 41]. This strain was grown in tubes containing 5 mL of tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 15 gL⁻¹ NaCl (TSBs) for 18 h at 22 °C, with continuous shaking. Appropriate dilutions of the culture were spread onto plates of tryptone soya agar (Oxoid) supplemented with 1.5 % NaCl (TSAS). The number of culturable bacteria was determined by plate counting on TSAS. Bacteria were recovered from the plates, frozen at -80 °C for 12 h, and then freeze-dried for 12 h with a FTS Systems Flexi-dry freeze dryer Model FD-1-84D-O (FTS Systems, Inc., NY, USA) equipped with a 2,400-A vacuum pump (Alcatel Cit, Annecy Cedex, France). The frozen samples were dried at a pressure of 0.075 mbar.

Fish and Experimental Diets

The experiments were carried out using specimens of farmed Senegalese sole of 26.7±4.6 g randomly distributed (140 fish per square meter) in 750-L seawater tanks connected to an open circulating system (35.4 gL⁻¹ salinity, at 18.3 °C±0.5 °C). Several fish were sampled for bacteriology to check the health status of stock. The specimens were dissected and sampling for internal organs (spleen, liver, and kidney) was carried out. The samples were cultured on TSAS (OXOID, Great Britain) supplemented with 1.5% (w/v) NaCl. All the inoculated plates were incubated at 22 °C for 48 h. Fish were acclimated for 2 weeks prior to the experimental period, and two groups of fish were fed with a commercial pellet diet Europa Elite LE2 (18% total lipids and 59% crude protein, Skretting, Spain) (diet I). This diet was used as the control. A second diet, prepared by supplementation of the commercial diet using only sodium alginate (Sigma, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (2 gkg⁻¹ fed) (diet II) was used to test the effect of the alginate on the intestinal microbiota. The

sodium alginate used in our study is a linear polymer of β -(1-4)-D-mannuronic acid and α -(1-4)-L-glucuronic acid residues. Typically, this material is composed of approximately 61% mannuronic acid and 39% glucuronic acid or M/G ratio 1.56. The experimental diets supplemented with the probiotic Pdp11 were prepared by supplementation of the commercial diet with fresh or lyophilized bacterial cells of the strain Pdp11 (dietS III and IV, respectively). An amount of the lyophilized or fresh bacterial cell preparation was suspended in sodium alginate solution (2 g kg^{-1} feed) to obtain a dose of 10^9 cfu g^{-1} feed. This dose was selected based on the health benefits in *S. aurata* and *S. senegalensis* as reported in previous studies [10, 41]. Each diet was assayed in duplicate.

The suspension was sprayed onto the feed and the mixture was kept under continuous agitation. After 10 min, the homogenized mixture was quickly sprayed with 50 mM calcium chloride (100 ml kg^{-1} feed) under continuous agitation. The gel was obtained by spraying the solution of CaCl_2 over the pellets impregnated with the bacterial-alginate solution.

DNA Extraction

The intestinal contents of five healthy fish from each group were sampled on day 60 after starting the experiment. The whole intestines were aseptically removed and stored separately at -80°C until further analysis.

The individual lumen intestinal contents were collected with 1 ml PBS pH 7.2, and a 1-ml aliquot was centrifuged at $1,000\times g$ for 5 min. Total DNA was extracted from each sample as described by [24] with some modifications. The samples were mixed with 300 μl of resuspension buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.01 M NaCl, 0.1 M EDTA, pH 8) and 300 μl of lysis buffer (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M EDTA, 0.01 M NaCl, 1% SDS, pH 8.0), gently inverting the tube to mix thoroughly. The samples were treated with 32 μl NaCl 6 M and proteinase K ($150 \mu\text{g/ml}$) at 55°C for 2 h. Next, we followed with RNAase A treatment (10 mg/ml) at 37°C for 1 h. Next, 6 M NaCl was added to reach a final concentration of 1.5 M. The solution was chilled on ice for 10 min followed by centrifugation at 13,000 rpm for 3 min. The clear supernatant containing genomic DNA was transferred to another tube containing an equal volume of isopropanol. The tubes were inverted gently several times. The DNA was pelleted by centrifugation at 13,000 rpm for 3 min. The DNA pellet was then washed in 70% ethanol. The dried DNA pellet was resuspended in 100 μl of TE buffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) and stored at 4°C . Agarose gel (1.5%, w/v) electrophoresis in the presence of ethidium bromide was used to check visually for DNA quality and yield.

Pure cultures of the probiotic strain Pdp11 were grown up to the exponential phase in TSBs and then centrifuged at $2,500\times g$ for 15 min. Pellets were washed with PBS and the resulting pellet was used for DNA extraction following the instructions of the Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA).

Amplification of 16S rDNA genes and analysis of PCR products by DGGE

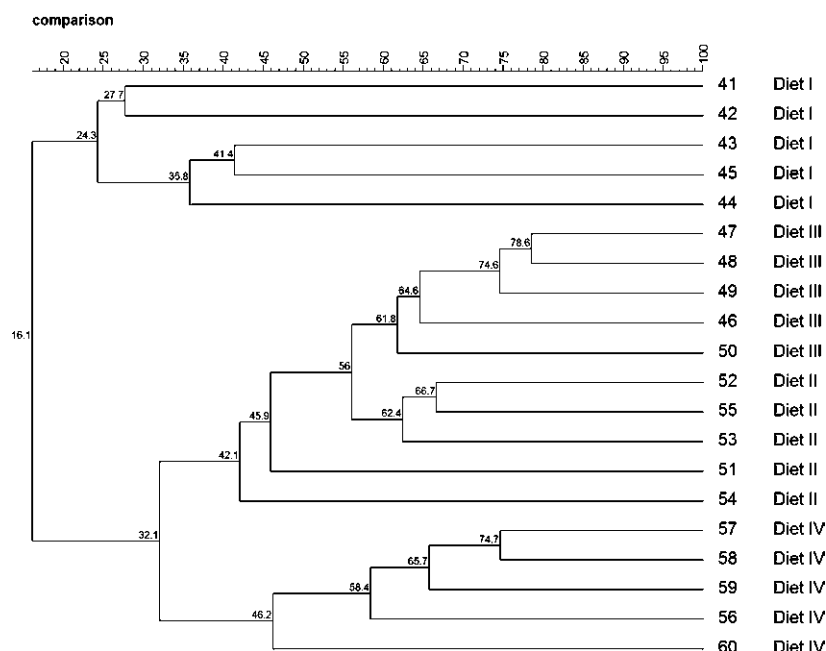
In order to compare DGGE patterns of the intestinal microbiota of soles receiving the different diets, the DNA was amplified using the 16S rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F (5' CGCCCGGGGCGCGCCCCGGGCGGCC-CGGGGGCACCGGGGAACGCGAAGAACCCTTAC-3') and 1401-R (5'CGGT-GTGTACAAGACCC-3') [18, 19]. These primers were used to amplify the V6–V8 regions of 16S rDNA [31] and yields amplicons of 470-bp length. PCR mixtures (50 μl) contained 1.25 U *Taq* polymerase (Life Technologies Gaithersburg, MD, USA), 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, 3 mM MgCl_2 , 200 μM of each deoxynucleoside triphosphate, 5 pmol of the primers, 1 μl of DNA template, and UV-sterilized water. The PCR was performed in a T1 thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) using 1 cycle of 94°C for 2 min, 35 cycles of 95°C for 30 s, 56°C for 40 s, and 72°C for 1 min, followed by 1 cycle of 72°C for 5 min. Aliquots (5 μl) were analyzed by electrophoresis on 1.5% (w/v) agarose gels containing ethidium bromide to check for product size and quantity.

The amplicons obtained from the intestinal lumen-extracted DNA and the probiotic strain were separated by DGGE according to the specifications of [29] using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). Electrophoresis was performed in an 8% polyacrylamide gel (37.5:1 acrylamide–bisacrylamide; dimensions, 200 by 200 by 1 mm) using 30% to 55% denaturing gradient for separation of PCR products. The gels contained 30% to 55% gradient of urea and formamide increasing in the direction of the electrophoresis. A 100% denaturing solution contained 7 M urea and 40% (v/v) deionized formamide. PCR samples were applied to gels in aliquots of 13 μl per lane. The gels were electrophoresed for 16 h at 85 V in 0.5 X TAE (20 mM Tris acetate [pH 7.4], 10 mM sodium acetate, 0.5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) buffer at a constant temperature of 60°C [42] and subsequently stained with AgNO_3 [44].

Analysis of DGGE Patterns

A DGGE analysis for all samples was performed twice. All gels were scanned at 400 dpi. The number of DGGE bands was calculated from the densitometric curves of the scanned

Figure 1 Clustering based on pairwise similarity index of DGGE patterns obtained from intestinal samples of five Senegalese sole specimens fed with a commercial control diet (diet I), commercial diet supplemented with 2 g kg⁻¹ feed of sodium alginate (diet II), commercial diet supplemented with 10⁹ cells g⁻¹ feed of fresh and lyophilized cells of Pdp11 (diet III and diet IV, respectively)



DGGE profiles with the software FPQuest 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). Clustering of DGGE patterns was achieved by construction of dendrograms using the Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages (UPGMA). Similarity between DGGE profiles was determined by calculating a band similarity coefficient (S_D) (Dice: $S_D = 2n_{AB}/(n_A + n_B)$), where n_A is the number of DGGE bands in line 1, n_B represents the number of DGGE bands in line 2, and n_{AB} is the number of common DGGE bands [19]. The values of Dice coefficients obtained for each treatment were compared using multiple range tests for similarity by diet. In order to determine the structural diversity of the microbial community corresponding to the DGGE banding pattern, two indices were calculated: (1) the Shannon index (H') was calculated following the function: $H' = -\sum P_i \log P_i$, where P_i is defined as (n_i/N) , n_i is the peak surface of each band, and N is the sum of all the peak surfaces of all bands and (2) the specific richness (R) was calculated based on the total number of bands. These data were processed by analysis of variance using the program STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statgraphics Corporation, Rockville, MD, USA).

Sequencing of DGGE Bands

Predominant bands in the DGGE gels were retrieved for sequencing with sterile pipette tips, placed in 100-μL of

double distilled water and incubated at 4 °C overnight. Five microliters of the volume was used as template in a PCR amplification reaction performed as described above. The product was re-run on DGGE to confirm its position and further subjected to cycle sequencing with primers 968—without the GC clamp (5'-AACGCGAAGAACCTTAC-3') and 1401-R. The PCR was performed in a T1 thermocycler (Whatman Biometra, Göttingen, Germany) using 1 cycle of

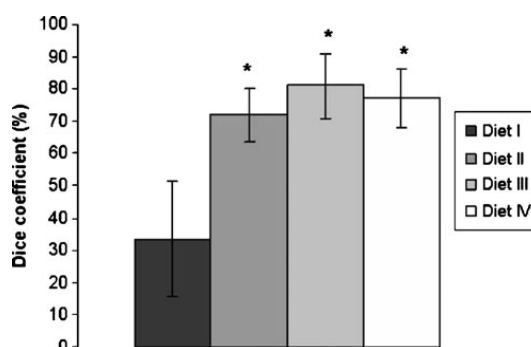


Figure 2 Dice coefficients for comparison between fish on the same diet. The values represent the mean of S_D from five specimens fed with the different diets assayed. Bars indicate the standard deviation between the DGGE profiles from fish on the same diet. Asterisk denote significant differences (<0.05) between diet I and the diets II, III, and IV

94 °C for 2 min, 28 cycles of 95 °C for 30 s, 56 °C for 40 s, and 72 °C for 1 min, followed by 1 cycle of 72 °C for 5 min. Products were purified using the High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche). The sequencing of the amplicons was performed on ABI PRISM 377 sequencer (Perkin-Elmer). The sequence was read from both directions with primers RV-M and M13-47, respectively. The resulting sequences (~500 bp) were compared with the sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) or Greengenes DNA sequence database using the BLAST sequence algorithm [1]. Database sequences showing the highest identity were used to infer identity. Although the high resolution of DGGE does not exclude the possibility that two different 16S rDNA sequences might migrate to exactly the same position, all sequences that migrated to the same position were sequenced.

Chimeric sequences were identified by using the CHECK CHIMERA program of the Ribosomal Database Project [21]. Phylogenetic analyses of clone libraries were performed by using the ARB software package [20], and sequences were aligned by using the positional tree server with a data set containing the nearest relative matches. Tree was constructed using the neighbor-joining (Jukes–Cantor correction) [39] algorithms implemented in ARB.

The sequences reported in this study have been deposited in the GenBank database under the following accession numbers: GU207494 to GU207501.

Results and Discussion

Bacterial diversity plays an important role in the functioning of microbial ecosystems, but there is scarce information on the interaction between the use of probiotics and the effects of these on the intestinal microbiota of fish. Due to the fact that Senegalese sole is a newly farmed fish species and no information is available on its intestinal microbiota, in this study, the fingerprinting technique PCR-DGGE has been used to analyze the structure of the intestinal microbial community of Senegalese sole and how it is affected by the administration of probiotics. This approach allows detection of the predominant bacteria present in the samples by sequencing the DGGE gel bands. The results derived from PCR-DGGE and sequencing of the excised bands have shown differences in the microbial composition of the intestinal samples from farmed Senegalese sole receiving the commercial diet, compared to those fish fed with a diet supplemented with fresh or lyophilized probiotics or sodium alginate. This ability to modulate the intestinal microbiota has been reported for other probiotics such as lactic acid bacteria which modulate

human fecal microbiota [14]. It could be attractive to consider whether *S. putrefaciens* Pdp11 may have a similar ability in fish.

When the clustering analysis was applied to the intestinal microbiota of the specimens, the dendrogram clearly revealed four clusters depending on the diet (Fig. 1). Microbial composition of intestinal samples from specimens fed with the diet I (control) showed a cluster with a very low similarity index (16.1%) compared to the other diets. The other three clusters grouped with a similarity index of 32%. The highest similarity index (61.8%)

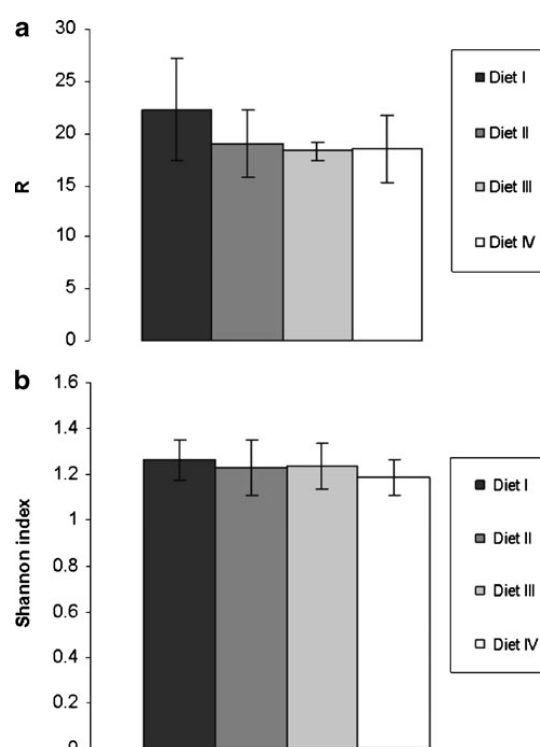


Figure 3 **a** Analysis of DGGE banding patterns. Number of DGGE bands (R) fed with the different diets assayed (diet I, commercial control diet; diet II, commercial diet supplemented with 2 g kg⁻¹ feed of sodium alginate; diet III, commercial diet supplemented with 10⁹ cells g⁻¹ feed of fresh Pdp11; diet IV, commercial diet supplemented with 10⁹ cells g⁻¹ feed of lyophilized cells of Pdp11). Significant differences were not observed among the number of DGGE bands from the intestines of fish fed with the different diets. 256×159 mm (96×96 DPI) **b** Analysis of DGGE banding patterns. Shannon index (H') from specimens fed with the different diets assayed (diet I, commercial control diet; diet II, commercial diet supplemented with 2 g kg⁻¹ feed of sodium alginate; diet III, commercial diet supplemented with 10⁹ cells g⁻¹ feed of fresh Pdp11; diet IV, commercial diet supplemented with 10⁹ cells g⁻¹ feed of lyophilized cells of Pdp11). Significant differences were not observed among the diversity of DGGE patterns from the intestines of fish fed with the different diets. 256×159 mm (96×96 DPI)

Table 1 16S rDNA sequence similarities to closest relatives of DNA recovered from the respective bands in the DGGE gel ("Electronic supplementary material", Figs. 1 and 2) corresponding to Senegalese sole fed with different diets

DGGE bands	Closest relative	Similarity (%)	GenBank accession number	Taxon
Diet I				
1	Uncultured gamma proteobacterium clone 123	90	EF188601	γ -Proteobacteria
2	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457532	γ -Proteobacteria
3	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
4	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
5	Uncultured <i>Serratia</i> sp. clone BSK1Q1u05	83	EU632013	γ -Proteobacteria
6	Uncultured cyanobacterium FL08E07	100	AF446263	γ -Proteobacteria
7	<i>Vibrio</i> sp. S3669	97	FJ457539	γ -Proteobacteria
8	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria
9	Uncultured gamma proteobacterium clone 123	90	EF188601	γ -Proteobacteria
10	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457532	γ -Proteobacteria
11	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	96	FJ605242	γ -Proteobacteria
12	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	96	FJ605242	γ -Proteobacteria
13	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
14	<i>Vibrio</i> sp. S3669	97	FJ457539	γ -Proteobacteria
15	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria
Diet II				
16	<i>Vibrio</i> sp. S2156	88	FJ457423	γ -Proteobacteria
17	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457539	γ -Proteobacteria
18	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria
19	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
20	<i>Vibrio</i> sp. S2156	92	FJ457423	γ -Proteobacteria
21	<i>Vibrio</i> sp. 54078	90	FJ457590	γ -Proteobacteria
22	<i>Vibrio</i> sp. S2156	92	FJ457423	γ -Proteobacteria
23	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457539	γ -Proteobacteria
24	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria
25	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	96	FJ605242	γ -Proteobacteria
26	<i>Vibrio</i> sp. 54078	90	FJ457590	γ -Proteobacteria
27	<i>Enterovibrio nigricans</i>	98	AM942724	γ -Proteobacteria
28	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
Diet III				
29	<i>Vibrio fortis</i> CIBAAG8	91	EU529836	γ -Proteobacteria
30	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	96	FJ605242	γ -Proteobacteria
31	<i>Vibrio</i> sp. S2156	96	FJ457423	γ -Proteobacteria
32	<i>Vibrio</i> sp. 4078	92	FJ457590	γ -Proteobacteria
33	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457539	γ -Proteobacteria
34	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
35	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
36	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria
37	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
38	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria
Diet IV				
39	<i>Vibrio</i> sp. S2156	88	FJ457423	γ -Proteobacteria
40	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457539	γ -Proteobacteria
41	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	98	FJ605242	γ -Proteobacteria
42	<i>Vibrio</i> sp. 54078	97	FJ457590	γ -Proteobacteria
43	<i>Enterovibrio nigricans</i>	98	AM942724	γ -Proteobacteria
44	<i>Vibrio harveyi</i> XCO8001	97	FJ605242	γ -Proteobacteria

Table 1 (continued)

DGGE bands	Closest relative	Similarity (%)	GenBank accession number	Taxon
45	<i>Vibrio</i> sp. S2156	96	FJ457423	γ -Proteobacteria
46	<i>Vibrio</i> sp. S2156	88	FJ457423	γ -Proteobacteria
47	<i>Vibrio</i> sp. 54078	97	FJ457590	γ -Proteobacteria
48	<i>Vibrio</i> sp. S3659	93	FJ457539	γ -Proteobacteria
49	<i>Vibrio harvey</i> XCO8001	98	FJ605242	γ -Proteobacteria
50	<i>Vibrio harvey</i> XCO8001	98	FJ605242	γ -Proteobacteria
51	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
52	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
53	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
54	<i>Bacterium</i> S1cc26	96	DQ416581	Low G+C Gram +
55	<i>Vibrio</i> sp. S3669	97	FJ457539	γ -Proteobacteria
56	<i>Vibrio azureus</i>	96	AB428898	γ -Proteobacteria

corresponded to the intestinal samples from specimens fed with diet III. The clusters corresponding to diets II and IV showed values of similarity of 42.1% and 46.2%, respectively. To examine the effect of the addition of sodium alginate and probiotic cells to their diet on the intestinal microbiota of Senegalese sole, Dice coefficients comparison was calculated between DGGE amplicons by performing multiple range tests for similarity by diet (Fig. 2). The results showed that those specimens receiving diets II, III, and IV had significantly higher intragroup similarity indices ($p < 0.05$) than those obtained from fish fed with diet I. Mean values of Dice coefficients showed that the intestinal microbiota of fish fed with diet III was significantly higher ($p < 0.05$) than those observed for specimens receiving diets II and IV. These results could suggest that the addition of probiotic and/or sodium alginate could exert an important influence on intestinal bacterial groups and yield a faster stabilization of the bacterial community. The results show that diets containing sodium alginate or probiotic cells did not produce significant changes in bacterial diversity, because the values of H' in the case of diets II, III, and IV were not significantly different to those obtained from the intestinal microbiota of fish fed with the control diet (diet I) (Fig. 3b). The influence of diet on the intestinal microbiota of Senegalese sole was studied based on DGGE analysis and examining the biodiversity according to the Shannon index (H') as a parameter which reflects the diversity of the whole microbial community. Band numbers on gradient gels ranged from 17 to 30 in the case of specimens fed with diet I and from 17 to 19 for fish receiving diet II. Band numbers ranged for diet III and IV from 17 to 19 and from 15 to 21, respectively (Fig. 3a). However significant differences in the number of DGGE bands were not detected among all diets assayed. The H' index calculated for all fish from all treatments ranged from 1.18 to 1.26

(Fig. 3b), and although it was higher in fish receiving diet I (1.26 ± 0.09) compared to the other diets, these values were not significantly different ($p > 0.05$), and this could indicate that the microbial communities in fish have a similar number of microbial groups, although it does not imply the presence of the same groups for each treatment. Therefore, it could be suggested that the H' index should not be the only parameter considered to check microbiota diversity and that this information should be completed with the data from the sequenced DGGE bands.

Several bands from diets I, II, III, and IV were excised ("Electronic supplementary material", Figs. 1 and 2), and DNA from these bands was sequenced. The bacterial species identified from the bands sequenced from the different diets assayed are summarized in Table 1. Excised DGGE bands were compared with BLAST references based on the phylogenetic relationship of the ~500 bp partial 16S rDNA sequence (Fig. 4). The primers used in this study have been previously used to analyze the fecal bacterial microbiota of pigs [19, 53] and fish [18]. Most of the regions sequenced could be identified to genus level (95% sequence similarity or subclass level) (Table 1). Bands with sequence similarities of $>97\%$ with published sequences from reference strains were generally assigned to the respective species. The majority of the sequenced bands showed less than 97% similarity with known sequences in the database. The 16S rRNA from the intestines of Senegalese sole specimens fed with all diets assayed showed that the microbiota were mainly Proteobacteria of the gamma subclass. This result agrees with the data reported for cultured fish, such as Senegalese sole [23] and the early stages of reared cod [4]. Gram-positive bacteria with low DNA G+C content were also identified. 16S rRNA sequencing of 56 bands from Senegalese sole specimens showed that *Vibrio* genus dominated the intestinal microbiota (about 78.6%). This genus is the predom-

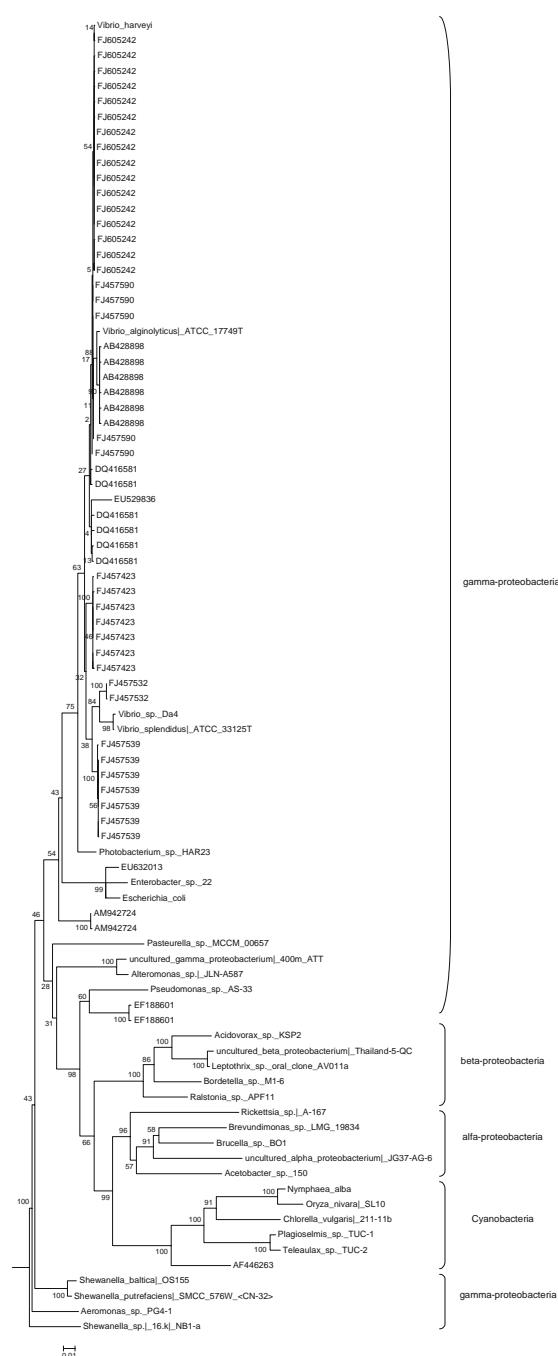


Figure 4 Phylogenetic tree of bacterial 16S rRNA gene sequences retrieved from the different samples. The tree was constructed from sequences obtained in this study and reference sequences by neighbor-joining procedures, using a bacterial filter, as implemented in ARB [20]. Accession numbers of reference sequences and 16S rRNA gene clones are provided in the figure. The reference *bar* indicates 10% sequence divergence

ese sole under different feeding diets confirmed the prevalence of the *Vibrio* species in the sole microbiota. Other isolates were sequenced as *Enterovibrio* (diets II and IV) and as an unidentified bacterial phylotype (*Bacterium*) (diets I, II and IV) (Table 1).

In the case of specimens fed with diet I, three bands included in the gamma-Proteobacteria could not be identified to genus level.

In our study, different DGGE bands corresponding to bacterial strains from fish fed with diet IV have shown the closest sequence similarity (>97%) to *V. harveyi* XCO8001. It is assumed that each DGGE banding pattern represents a distinct microbial strain with a unique sequence. However, in this study, bands with different mobility within the same DGGE pattern corresponded to the same bacterial species such as *V. harveyi*. These results have also been reported by other authors who analyzed the strain-specific differentiation of environmental *E. coli* isolates [5]. This could be due to the heterogeneity between copies of 16S rDNA on the bacterial genome [28], and it could induce heteroduplex formation with a changed motility in DGGE [4]. *V. harveyi* has been reported as pathogenic for Senegalese sole although some strains have been reported as non-virulent [36]. [23] reported that *V. harveyi* was found only in experiments with Senegalese sole specimens reared under intensive conditions at 18 °C and fed with a commercial diet. DGGE bands sequenced from fish fed with all diets assayed were related to *Vibrio* genus, possibly *V. azureus*, which is a luminous marine bacterium isolated from seawater and described recently as a novel species [54].

The results obtained indicated that, in comparison with the control diet (diet I), the use of sodium alginate reduced the presence of uncultured cyanobacterium FL08E07 until non-detectable limits. The high-M alginate is known to be an immunostimulant with potential in marine aquaculture [8], and it has been used to encapsulate microbial cells to enhance their viability [9]. Its modulation effect on the microbiota could be based on the results reported by [52], who demonstrated the in vivo prebiotic properties of the oligosaccharide obtained from the enzymatic hydrolysis of alginate polymer. However, the absence of these bands in fish fed with the other diets may not exclude the presence of the same bacterial species in the samples, since they could be below the detection limit of the DGGE technique which has an abundance limit of 1% [13], and thus the contribution to

inant microbial group detected in the intestine of marine flat fish, such as Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) [48] and *Paralichthys dentatus* [12]. [23] studying the cultured intestinal microbiota variation in farmed Senegal-

diversity of less-abundant taxons is underestimated and the subtle variations in the community might be undetected [38]. However, [34] proposed that those less-abundant taxons are less relevant for the functioning of the microbial community.

DGGE bands related to *Enterovibrio* genus (possibly *E. nigricans*) were identified with a similarity of 98% from sequenced DGGE bands from fish receiving diets II and IV. This microorganism has been described recently as a novel species of the *Enterovibrio* genus by [32], who studied 11 strains of halophilic and facultative anaerobes isolated from healthy and diseased *Dentex dentex* and *S. aurata* farmed in Spanish fisheries.

In a previous study, [40] evaluated the effect of two probiotics, one of which was *S. putrefaciens* Pdp11, on the intestinal functionality of Senegalese sole, and they observed that the enterocytes of fish fed with the probiotic supplemented diet showed a normal appearance, in comparison with the enterocytes of control fish receiving a commercial diet, which showed a high number of big lipid inclusions. These authors presumed that the functionality of such enterocytes should be better than that of the control group and could contribute to the higher growth observed in fish receiving probiotics. It could be attractive to consider whether these effects on the intestinal functionality were due to the influence of the probiotic microorganism on the intestinal microbiota.

[23] detected *Shewanella* spp. among the members of the intestinal microbiota of farmed Senegalese sole under a semi-intensive production system, and the frequency of isolation of this genus increased in the case of an extensive production system. In our study, *Shewanella* spp. has not been detected, and it could be due to the fact that only the cultured intestinal microbiota was evaluated in Martin-Antonio's study, whilst in our study an evaluation of both cultured and non-cultured microbiota was carried out. In this way, the results of [23] could suggest an increased dominance of bacterial groups which in vivo conditions may not be as relevant.

In short, a change has been demonstrated in the bacterial community associated with on-growing specimens of Senegalese sole based on the supplementation of the diet with alginate or probiotic microorganisms.

Acknowledgements The authors are grateful for the financial support of the Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (AGL 2005-07454-CO2-O2 and AGL2008-05119-CO2-O2) and the Junta de Andalucía (AGR-1842). S. Tapia-Paniagua wishes to thank the Ministerio Español de Educación y Ciencia for an F.P.U. scholarship.

References

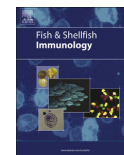
- Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ (1990) Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403–410
- Austin B, Stuckey LF, Robertson PAW, Effendi I, Griffith DRW (1995) A probiotic strain of *Vibrio alginolyticus* effective in reducing diseases caused by *Aeromonas salmonicida*, *Vibrio anguillarum* and *Vibrio ordalii*. *J Fish Dis* 18:93–96
- Balcázar JL, de Blas I, Ruiz-Zarzuela I et al (2006) The role of probiotics in aquaculture. *Vet Microbiol* 114:173–186
- Brunvold L, Sandaa RA, Mikkelsen H et al (2007) Characterisation of bacterial communities associated with early stages on intensively reared cod (*Gadus morhua*) using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). *Aquaculture* 272:319–327
- Buchan A, Alber M, Hodson RE (2001) Strain-specific differentiation of environmental *Escherichia coli* isolates via denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) analysis of the 16S–23S intergenic spacer region. *FEMS Microbiol Ecol* 35:313–321
- Chabrillón M, Rico RM, Arijo S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriño MA (2005) Interactions of microorganisms isolated from gilthead seabream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* 28:531–537
- Chabrillón M, Rico RM, Balebona MC, Moriño MA (2005) Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *J Fish Dis* 28:229–237
- Cheng A-C, Tu C-W, Chen Y-Y, Nan F-H, Chen J-C (2007) The immunostimulation effects of sodium alginate and iota-carrageenan on orange-spotted grouper *Epinephelus coioides* and its resistance against *Vibrio alginolyticus*. *Fish Shellfish Immunol* 22:197–205
- Crittenden R, Weerakkody R, Sanguansri L, Augustin M (2006) Synbiotic microcapsules that enhance microbial viability during nonrefrigerated storage and gastrointestinal transit. *Appl Environ Microbiol* 72:2280–2282
- Díaz-Rosales P, Salinas I, Rodríguez A et al (2006) Gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) innate immune response alter dietary administration of heat-inactivated potential probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 20:482–492
- Díaz-Rosales P, Arijo S, Chabrillón M et al (2009) Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes and protection against *Photobacterium damsela* subsp *piscicida*. *Aquaculture* 293:16–21
- Eddy SD, Jones SH (2002) Microbiology of summer flounder *Paralichthys dentatus* fingerling production at a marine fish hatchery. *Aquaculture* 211:9–28
- Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S et al (2002) Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 4:634–643
- Garrido D, Suan A, Pochart P, Cruchet S, Gotteland M (2005) Modulation of the fecal microbiota by the intake of a *Lactobacillus johnsonii* La-1 containing product in human volunteers. *FEMS Microbiol Lett* 248:249–256
- Gómez GD, Balcázar JL (2008) A review on the interactions between gut microbiota and innate immunity of fish. *FEMS Immunol Med Mic* 52:145–154
- Gram L, Melchiorson J, Spanggaard B, Huber I, Nielsen TF (1999) Inhibition of *Vibrio anguillarum* by *Pseudomonas fluorescens* Ah2, a possible probiotic treatment of fish. *Appl Environ Microbiol* 65:969–973
- Hume ME, Kubena LF, Edrington TS et al (2003) Poultry digestive microflora biodiversity as indicated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Poultry Sci* 82:1100–1107
- Kim DH, Austin B (2006) Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol* 21:513–524
- Konstantinov SR, Zhu WY, Williams BA et al (2003) Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities

- as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis of 16S ribosomal DNA. FEMS Microbiol Ecol 43:225–235
20. Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L et al (2004) ARB: a software environment for sequence data. Nucleic Acids Res 32:1363–1371
 21. Maidak BL, Cole JR, Parker CT Jr, Garrity GM et al (1999) A new version of the RDP (Ribosomal Database Project). Nucleic Acids Res 27:171–173
 22. Makridis P, Martins S, Reis J, Dinis MT (2008) Use of probiotic bacteria in the rearing of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquacult Res 39:627–634
 23. Martín-António B, Manchado M, Infante C et al (2007) Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. Aquacult Res 38:1213–1222
 24. Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S (1998) Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. Biotechniques 24:138–139
 25. McIntosh DJB, Forward BS, Puvanendran V, Boyce D, Ritchie R (2008) Culture-independent characterization of the bacterial populations associated with cod (*Gadus morhua*) and live feed at an experimental hatchery facility using denaturing gradient gel electrophoresis. Aquaculture 275:42–50
 26. Merrifield DL, Burnard D, Bradley G (2009) Microbial community diversity associated with the intestinal mucosa of farmed rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). Aquacult Res 40:1064–1072
 27. Mohamed NM, Enticknal JJ, Lohr J, McIntosh SM, Hill RT (2008) Changes in bacterial communities of the marine sponge *Mycall laxissima* on transfer into aquaculture. Appl Environ Microbiol 74:1209–1222
 28. Moreno C, Romero J, Espejo RT (2002) Polymorphism in repeated 16S rRNA genes in a common property of type strains and environment isolates of the genus *Vibrio*. Microbiol 148:1233–1239
 29. Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700
 30. Nedoluha PC, Westhoff D (1997) Microbiology of striped bass grown in three aquaculture systems. Food Microbiol 14:255–264
 31. Nübel U, Engelen B, Felske A et al (1996) Sequence heterogeneities of genes encoding 16S rRNAs in *Paenibacillus polymixa* detected by temperature gradient gel electrophoresis. J Bacteriol 178:5636–5643
 32. Pascual J, Macián MC, Arahál DR, Garay E, Pujalte MJ (2009) Description of *Enterovibrio nigricans* sp nov., reclassification of *Vibrio calviensis* as *Enterovibrio calviensis* comb. Nov. and amended description of the genus *Enterovibrio* Thompson et al. 2002. Int J Syst Evol Microbiol (vol 59, pg 698, 2009) 59:1850–1850
 33. Payne MS, Hall MR, Sly L, Bourne DG (2007) Microbial diversity within early-stage cultured *Panulirus ornatus phyllosomas*. Appl Environ Microbiol 73:1940–1951
 34. Pedros-Alío C (2006) Marine microbial diversity: can it be determined? Trends in Microbiol 14:257–263
 35. Rawls JF, Samuel BS, Gordon JI (2004) Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota. Proc Nat Acad Sci USA 101:4596–4601
 36. Rico RM, Tapia-Paniagua S, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Morínigo MA (2008) Characterization of *Vibrio harveyi* strains recovered from diseased farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*). J Appl Microbiol 105:752–760
 37. RingØ E, Strøm E, Tabachek JA (1995) Intestinal microflora of salmonids. A review. Aquacult Res 26:773–789
 38. Sadet S, Martin C, Meunier B, Morgavi DP (2007) PCR-DGGE analysis reveals a distinct diversity in the bacterial population attached to the rumen epithelium. Animal 1:939–944
 39. Saitou N, Nei M (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol Biol Evol 4:406–425
 40. Sáenz de Rodríguez MA, Díaz-Rosales P, Chabrállón M et al (2009) Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). Aquac Nutr 15:177–185
 41. Salinas I, Díaz-Rosales P, Cuesta A et al (2006) Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). Vet Immunol Immunopathol 111:279–286
 42. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989) Molecular cloning: a laboratory manual. In: Sambrook J, Russell DW (eds) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, p. 1689
 43. Sandaa RA, Magnesen T, Torkildsen L, Bergh Ø (2003) Characterisation of bacterial communities associated with early life stages of cultured great scallop (*Pecten maximus*), using denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE). Syst Appl Microbiol 26:302–311
 44. Sanguinetti CJ, Dias Neto E, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. BioTechniques 17:915–919
 45. Schiffrin E, Blum S (2002) Interactions between the microbiota and the intestinal mucosa. Euro J Clin Nutr 56:S60–S64
 46. Spanggaard B, Huber I, Nielsen J et al (2001) The probiotic potential against vibriosis of the indigenous microflora of rainbow trout. Environ Microbiol 3:755–767
 47. Stevens C, Hume I (1998) Contributions of microbes in vertebrate gastrointestinal tract to production and conservation of nutrients. Physiol Rev 78:393–427
 48. Sugita H, Ito Y (2006) Identification of intestinal bacteria from Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) and their ability to digest chitin. Lett Appl Microbiol 43:336–342
 49. Sugita H, Miyajima C, Deguchi Y (1991) The vitamin B12-producing ability of the intestinal microflora of freshwater fish. Aquaculture 92:267–276
 50. Uchii K, Matsui K, Yonekura R et al (2006) Genetic and physiological characterization of the intestinal bacterial microbiota of bluegill (*Lepomis macrochirus*) with three different feeding habits. Microb Ecol 51:277–283
 51. Verschuere L, Rombaut G, Sorgeloos P, Verstraete W (2000) Probiotic bacteria as biological control agents in aquaculture. Microbiol Mol Biol Rev 64:655–671
 52. Wang Y, Han F, Hu B, Li JB, Yu WG (2006) In vivo prebiotic properties of alginate oligosaccharides prepared through enzymatic hydrolysis of alginate. Nutr Res 26:597–603
 53. Wang H-F, Zhu W-Y, Yao W, Liu J-X (2007) DGGE and 16S rDNA sequencing analysis of bacterial communities in colon content and feces of pigs fed whole crop rice. Anaerobe 13:127–133
 54. Yoshizawa S, Wada M, Kita-Tsukamoto K et al (2009) *Vibrio azureus* sp. nov., a luminous marine bacterium isolated from seawater. Int J Syst Evol Microbiol 59:1438–1442



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

Dietary administration of the probiotic SpPdp11: Effects on the intestinal microbiota and immune-related gene expression of farmed *Solea senegalensis* treated with oxytetracycline



S.T. Tapia-Paniagua ^a, S. Vidal ^a, C. Lobo ^b, I. García de la Banda ^b, M.A. Esteban ^c,
M.C. Balebona ^a, M.A. Morínigo ^{a,*}

^a Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Santander, 39080 Santander, Spain

^c Innate Immune System Group, Department of Cell Biology and Histology, Faculty of Biology, Campus Regional de Excelencia Internacional "Campus Mare Nostrum", University of Murcia, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 April 2015

Received in revised form

8 July 2015

Accepted 14 July 2015

Available online 17 July 2015

Keywords:

Antibiotics

Oxytetracycline

Probiotics

Shewanella putrefaciens Pdp11

Microbiota

Gene expression

Senegalese sole (*Solea senegalensis*)

ABSTRACT

Few antimicrobials are currently authorised in the aquaculture industry to treat infectious diseases. Among them, oxytetracycline (OTC) is one of the first-choice drugs for nearly all bacterial diseases. The objective of this study was to evaluate the effect of the dietary administration of OTC both alone and jointly with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11) on the intestinal microbiota and hepatic expression of genes related to immunity in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. The results demonstrated that the richness and diversity of the intestinal microbiota of fish treated with OTC decreased compared with those of the control group but that these effects were lessened by the simultaneous administration of SpPdp11. In addition, specimens that received OTC and SpPdp11 jointly showed a decreased intensity of the Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) bands related to *Vibrio* genus and the presence of DGGE bands related to *Lactobacillus* and *Shewanella* genera. The relationship among the intestinal microbiota of fish fed with control and OTC diets and the expression of the NADPH oxidase and CASPASE-6 genes was demonstrated by a Principal Components Analysis (PCA) carried out in this study. In contrast, a close relationship between the transcription of genes, such as NKEF, IGF- β , HSP70 and GP96, and the DGGE bands of fish treated jointly with OTC and SpPdp11 was observed in the PCA study. In summary, the results obtained in this study demonstrate that the administration of OTC results in the up-regulation of genes related to apoptosis but that the joint administration of OTC and *S. putrefaciens* Pdp11 increases the transcription of genes related to anti-apoptotic effects and oxidative stress regulation. Further, a clear relationship between these changes and those detected in the intestinal microbiota is established.

© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Antimicrobials are extensively used in the aquaculture industry to treat and prevent infectious diseases [1–3]. The significant negative impact that the large volume of antimicrobials used in recent years has both on the environment and on increased resistance has been widely demonstrated [4–6,3,7–10]. This evidence has led to a drastic restriction in the use of antibiotics in this industry [11,3,12,8], and very few antimicrobials have been

authorised for use in the treatment of bacterial diseases. Furthermore, one of the most common routes of administration for anti-bacterial agents in farmed fish is through diet [13]. In this sense, it has been demonstrated that this practice can result in disturbances in the normal structure of the intestinal microbial community [14]. Oxytetracycline (OTC) is one of the first-choice drugs for nearly all bacterial diseases in aquaculture [15,13,16,17]. However, OTC administration has also been associated with immunosuppressive effects in farmed fish [18,16], with the appearance of some alterations in the liver of tilapia (*Oreochromis niloticus*) [19] and in the diversity of the intestinal microbiota of farmed Atlantic salmon (*Salmo salar*) [20]. These last aspects are very important because of

* Corresponding author.

E-mail address: morinigo@uma.es (M.A. Morínigo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2015.07.007>

1050-4648/© 2015 Elsevier Ltd. All rights reserved.

the crucial role that the liver and the intestinal microbiota play in numerous nutritional and physiological functions and in the innate immune responses [21–26]. As a result of the essential role of the gut microbiota in host life, these imbalances may have deleterious effects on the liver and, consequently, on host health [27]. In addition, antibiotics could suppress some protective members of the intestinal microbiota, thereby promoting the overgrowth of opportunistic bacteria [28]. For this reason, the development of tools that are focused on reducing the detectable adverse effects is now one of the priorities for the aquaculture industry. One of the possible strategies to be applied in fish production could be the use of probiotics such as *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (SpPdp11), which has a remarkable ability to modulate intestinal microbiota, thereby improving the liver condition in farmed Senegalese sole [29–31].

Thus, the aim of the present study was to evaluate the effects that the dietary administration of OTC in isolation or combined with the probiotic SpPdp11 could exert on the intestinal microbiota and the expression of genes related to immunity, oxidative-stress and apoptosis in the liver of Senegalese sole juveniles. The possible correlations between the results obtained are discussed below.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms

S. putrefaciens Pdp11 (SpPdp11) cells were cultured following the methodology described previously [30]. Bacterial suspensions were prepared by scraping cells from the plates and washing in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4). The bacterial concentration was determined using a plate count on tryptone soya agar (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) that was supplemented with 1.5% NaCl (TSAs) and adjusted to 10^{11} CFU mL⁻¹.

2.2. Experimental design

In total, 120 healthy farmed Senegalese sole juveniles (14.57 ± 0.71 g mean body weight) from the stock of the Spanish Institute of Oceanography (Santander, Spain) were randomly distributed in six 150-L seawater tanks (two tanks per treatment) that were connected to an open circulating system (35.4 g L⁻¹ salinity, 16.6 °C \pm 0.5 °C) with a renovation rate of 300% day⁻¹. Specimens were acclimated for 2 weeks prior to the experimental period. Ten fish were dissected, and samples of spleen, liver and kidney were cultured on TSAs at 22 °C for 48 h to confirm the health status of the fish. Sole juveniles were fed eight times a day with a commercial pellet diet Gemma 1.8 Diamond (18% total lipids and 55% crude protein, SKRETTING, Burgos, Spain). The initial fish weight was used to adjust the daily ration of feed according to the normal pattern in this species (20 g kg⁻¹).

After the acclimation period, fish received three different experimental diets: commercial diet (control group), commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC (Hebei Shengxue Dacheng Pharmaceutical Co. Ltd., Shijiazhuang, China) (OTC group) or commercial diet supplemented with OTC (40 mg kg⁻¹) and SpPdp11 bacterial cells (OTC + SpPdp11 group). The experimental diets were prepared in the laboratory. SpPdp11 supplementation of the diets was carried out according to the methodology described previously [30] to obtain a dose of 10^9 CFU g⁻¹ feed, which has positive effects in *Solea senegalensis* [32] (OTC + SpPdp11 group).

2.3. Analysis of the intestinal microbiota

After 10 days of treatment with OTC, whole intestines of six fish

per treatment were aseptically removed and stored separately at -20 °C until further analysis. Individual intestinal lumen contents were collected with 1 ml PBS pH 7.2, and 1 ml aliquot per sample was centrifuged ($1000 \times g$, 5 min). Total DNA was extracted from each sample as described by Martinez et al. (1998) [33]. Pure cultures of the probiotic strain SpPdp11 were grown to exponential phase in TSBs and then centrifuged ($2500 \times g$, 15 min). Pellets were washed with PBS and used for DNA extraction following the instructions of the Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA). DNA was amplified using the 16S rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F (5'-GAACGCGAAGAACCTTAC-3') and 1401-R (5'-CGGTGTGTACAA GACCC-3'). Primer 968-CG-F included a 35 pb GC clamp. The PCR mixtures and conditions used to perform PCR were as previously described [30]. The amplicons obtained were separated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) according to previous specifications [34] using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA). The gels were subsequently stained with AgNO₃ [35].

DGGE banding patterns were analysed using the FPQuest Software version 4.5 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A matrix of similarities for the densitometric curves of the band patterns was calculated using the Bray–Curtis index. Clustering of DGGE patterns was achieved by constructing dendrograms using the Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Averages (UPGMA). Species richness (R) and Shannon's diversity index (H') of microbial communities were determined [30], considering that a relevant band must be present in the DGGE profiles of at least three of the five specimens analysed per diet.

2.4. Cloning of the PCR amplified products

DNA was extracted and PCR was performed using universal primers for bacterial 16S rDNA. The forward primer was S-D-Bact-0008-as-20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG-3') [36], and the reverse primer was S*-Univ-1492-b-A-21 (5'-ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') [37]. Amplification was carried out as previously described [38], and PCR products were purified and concentrated using the High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR products were cloned into a pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA). Ligation was performed at 4 °C overnight followed by transformation into competent *Escherichia coli* JM109. One hundred colonies of ampicillin-resistant transformants from each diet and day sampled were transferred with a sterile toothpick to 100 µl TE buffer and boiled for 10 min at 95 °C. PCR was then immediately performed with pGEMT-specific primers T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3') and SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'). Plasmids that contained an insert were used to amplify the V6–V8 region of 16S rDNA. The amplicons were compared with the bands of DGGE patterns and used for sequence analysis (Macrogen Korea sequencing). They were compared with the sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST sequence algorithm [39].

2.5. RNA isolation and gene expression analysis

Samples of liver from six specimens of the control, OTC and OTC + SpPdp11 groups were aseptically removed, immediately frozen in liquid nitrogen and stored separately at -80 °C until analysis. Individual liver samples (300 mg) were recovered, and total RNA was extracted using the GeneJET RNA Purification kit (Thermo Scientific, Spain) according to the manufacturer's instructions. RNA obtained was compared with the RiboRuler Low range RNA Ladder (Thermo Scientific, Madrid, Spain), and the RNA quality was checked electrophoretically ($A260/A280 = 1.9$ – 2) and

quantified spectrophotometrically. Total RNA isolated was treated with DNAase using the DNAase I, RNAase free kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) for 30 min to remove genomic DNA contamination. The RNA sample quality was checked on an agarose gel, and quantification was performed spectrophotometrically. Complementary DNA (cDNA) was synthesised from 1 µg of total RNA using the First Strand cDNA Synthesis kit (Thermo Scientific, Madrid, Spain) according to the manufacturer's instructions.

Real-time PCR analysis was carried out using an ABI PRISM 7500 (BioRad, Madrid, Spain). Reactions were carried out in a 20 µl volume containing 16 µl of 2× SYBR Green supermix (BioRad, Madrid, Spain), 2 µl of primers (0.6 µM) (Table 1) and 2 µl of cDNA template. The amplification protocol used was as follows: initial denaturation for 10 min at 95 °C, followed by 40 cycles of 95 °C for 15 s and 60 °C for 1 min, and finally 5 s at 95 °C. The primers and amplification protocols used for expression were as previously reported for the HSP70, HSP90AB and HAMP-1 genes [31]; TF and NKEF [40]; IGF-β and GP96 [41] and [42], respectively. For CASPASE-6, GPx and NADPHox, the protocol was the same as previously reported [43], but the annealing temperature was modified to 63 °C. Each assay was performed in triplicate. For the normalisation of cDNA loading, all samples were run in parallel with the housekeeping gene glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH-1) [44]. Relative mRNA expression was determined using the ΔCt method relative to the reference gene [45]. Control treatments were used as calibrators. To compare the amount of each of the Senegalese sole transcripts, the relative mRNA expression was determined by subtracting the Ct value of GAPDH mRNA from the Ct value of the target mRNA. The data were then expressed as the ratio of target mRNA to reference (GAPDH-1) mRNA.

2.6. Statistical analysis and principal component analysis (PCA)

Statistical analysis of results obtained by real-time PCR were analysed by one-way analysis of variance (ANOVA) to determine differences between groups. Normality of the data was previously assessed using a Shapiro–Wilk test and homogeneity of variance was also verified using the Levene test using the program STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statgraphics Corporation, Rockville, MD, USA).

The Kruskal–Wallis test was used to test the significance of the differences in species richness (R) and diversity (H') using the

program STATGRAPHICS Plus 5.0.

PCA was applied to correlate variables determined in the liver of fish fed assayed diets and microbial species detected in the intestinal microbiota using XLSTAT 2012 software (Addinsoft, Barcelona, Spain).

3. Results

3.1. Intestinal microbiota

Cluster analysis based on the Bray–Curtis similarity of band patterns obtained from the fish that were treated for 10 days with OTC showed clearly defined clusters related to the antibiotic treatment and the administration or non-administration of the probiotic strain (Fig. 1). The majority of the DGGE patterns corresponding to the different groups exhibited similarity percentages between 45% and 62%. Similar results were visualised in NMDS plots (Fig. 2), which showed significant differences ($p < 0.001$) between control fish and those receiving OTC alone or combined with SpPdp11.

The differences visualised in the NMDS plots were concordant with significant variations in the ecological parameters analysed. The values of richness, which were considered to be the numbers of bands, are summarised in Table 2. Feeding with OTC for 10 days produced a significant reduction in the intestinal microbiota richness, whereas specimens fed with OTC + SpPdp11 showed a significant increase in intestinal microbiota richness compared with the control and OTC groups. Similar results were observed when the Shannon's diversity index was considered (Table 2), which indicated a significant reduction of diversity in the OTC group but an increase in this parameter in the OTC + SpPdp11 group.

A taxonomic distribution of identifiable 16S rDNA of the bands sequenced from DGGE patterns is summarised in Table 3. The most frequently sequenced bands detected in the intestinal microbiota of fish from all treatments were identified as γ-Proteobacteria and showed percentages ranging from 65.65% to 94.23% of the total intensity. It was observed that fish treated with OTC + SpPdp11 showed the highest phylogenetic diversity, as they presented Mollicutes, Firmicutes, Actinobacteria and Acidobacteria, which were not detected in the DGGE patterns of the specimens from the other groups. Conversely, the single administration of OTC resulted

Table 1
Primers used for relative mRNA quantifications by real-time PCR.

Target ^a (GenBank)	Accession number GenBank	Primer sequence ^c (5'–3')	Length (bp) ^b	Reference
CASPASE-6	AF212219	R: TGGTCTACACCTCTCCCTGCT F: GCTCCTCATGGACACCTTCC	140	[43]
GPx	BG934453	F: GATTGCTTCAAACTCCTGCTA R: GCTCCAGAACAGCCTGTTG	212	[43]
GP96	FJ263549	F: GAGTCTTCTCCCTTTGTGAGCGGCT R: TGATGCCTTCTTTGCCAGCTTCTG	142	[42]
HAMP-1	FJ263548	F: ATGAAGGCATTGACATTGCAGTTGC R: CGKKAMTCTCTCAGAACYTRCAGCAG	279	[31]
HSP70	FF682335	F: CCGTGATCTCAACAGACATCAACCTCG R: GCCTCCAGCGGTTTCAATTCCCG	157	[31]
HSP90AB	AB367526	F: TCAGTTTGGTGGGTTTCTACTCGGCTTAC R: GCCAAGGGGCTCACCTGTGTCTG	148	[31]
IGF-β	AY996779	F: TGTCTAGCGCTCTTCTTTTCA R: AGAGGGTGTGGCTACAGGAGATAC	100	[41]
NADPHox	AB192465	F: CATCGCCACCTGTTAACT R: GTATGACCTCGCGATGACCT	250	[43]
NKEF	FF682565	F: GGAGTGTCTGAAGGAGGACGATGATTG R: TCCGTGTTGGTCAGTGTGCTGGAAG	137	[40]
TF	FF682265	F: CGTGTATCGCTCTCATCTCTGGGTTTG R: CTACTTCAGTGAGAGCTGTGCCCTGGAG	119	[40]

^a Gene symbols are according to the NCBI Gene database.

^b PCR product size (bp).

^c Sequence of forward (F) and reverse (R) primers.

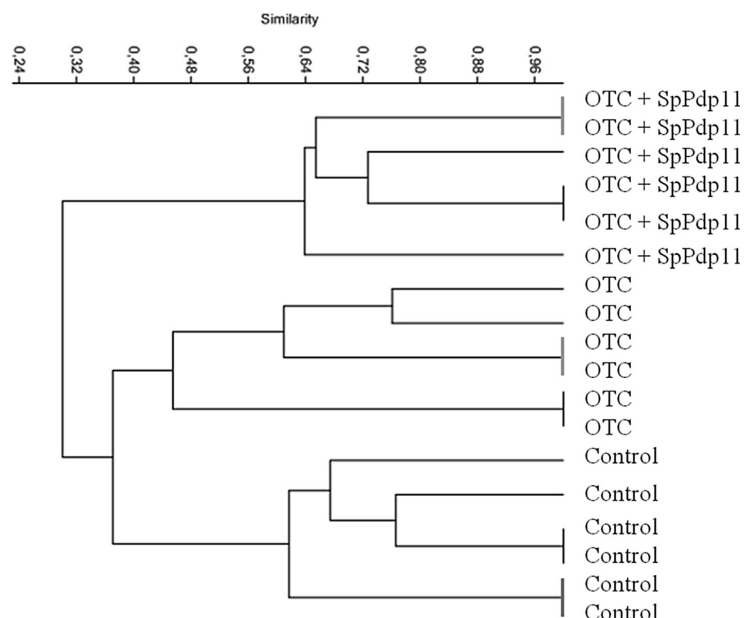


Fig. 1. Cluster analysis of DGGE patterns of the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens fed for 10 days with commercial diet (control), commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC (OTC) or commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC and 10⁹ CFU of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 g⁻¹ feed (OTC + SpPdp11).

in the presence of bands related to *Allivibrio fischeri*, which were not registered in the intestinal microbiota of the control and OTC + SpPdp11 fish. The OTC + SpPdp11 diet induced the presence

of bands related to microorganisms such as *Acinetobacter johnsoni* and *Shewanella* genus, whereas a significant reduction in the percentage of intensity corresponding to bands related to *Vibrio* genus was observed. Furthermore, Firmicutes, which is another important bacterial group, was exclusively detected in the OTC + SpPdp11 fish and represented approximately 8% of the total intensity of the bands of DGGE patterns. Thus, the bands related to *Bacillus aquimaris*, *Lactobacillus fermentum* and *Candidatus Arthromitus* were only present in the DGGE patterns of these last specimens (Table 3).

3.2. Gene expression

The gene transcription levels in fish liver treated with OTC and OTC + SpPdp11 in relation to control specimens are summarised in Fig. 3. Liver samples from OTC fish showed a significant increase in mRNA levels corresponding to CASPASE-6, NADPHox, TF, HAMP-1, IGF-β and GP96 genes. In contrast, except for the CASPASE-6 gene, which showed significantly lower levels of transcription,

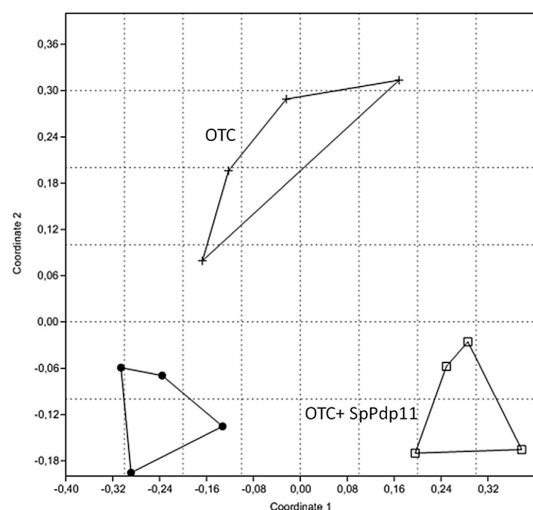


Fig. 2. Non metric multidimensional scaling (NMDS) plots using the Bray–Curtis index of the DGGE patterns associated with the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens fed for 10 days with commercial diet (control), commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC (OTC) or commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC and 10⁹ CFU of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 g⁻¹ feed (OTC + SpPdp11).

Table 2
Species richness (R) (expressed as number of different bands) and Shannon index (H') values of intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens untreated or receiving a commercial diet with OTC (OTC) or OTC + probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (OTC + SpPdp11) in the diet during a period of 10 days. Values with different superscript are significantly different ($p < 0.05$) compared to the control.

Treatment	Control	OTC	OTC + SpPdp11
R	15.20 ± 2.00	7.50 ± 1.11 ^a	27.50 ± 3.77 ^{ab}
H'	2.36 ± 0.04	1.85 ± 0.23 ^a	3.17 ± 0.15 ^{ab}

a: significant differences ($p < 0.05$) between the OTC diet compared to the control diet.

b: significant differences ($p < 0.05$) between OTC + SpPdp11 compared to the OTC diet.

Table 3

Mean percentage of intensity and nearest-match identification of 16S rDNA sequences corresponding to intestinal microbiota of Senegalese sole specimens from control group and groups treated with OTC and OTC + SpPdp11 specimens for 10 days.

No band	Related microorganism	GenBank accession	Similarity %	Treatment control	Treatment OTC	Treatment OTC + SpPdp11
γ-Proteobacteria						
56	<i>Acinetobacter johnsonii</i> MA19	DQ864703	100			3.73
23	<i>Allivibrio fischeri</i> OT162	AB239367	100		8.56	
22	<i>Pseudoalteromonas atlantica</i>	AB049728	98	8.06	9.87	1.40
19	<i>Pseudoalteromonas</i> sp OC-2	AY669164	99	4.72		
59	<i>Pseudoalteromonas aliena</i> KMM	NR_025775	99			3.97
29	<i>Pseudomonas</i> sp GD	EU233276	98		10.50	
52	<i>Pseudomonas acephalitica</i> Ind01	AM407893	100			2.90
60	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	AJ308303	100			4.73
61	<i>Pseudomonas</i> sp	DQ219370	99			4.27
32	<i>Shewanella</i> MJ 5323	DQ531951	97			3.28
36	<i>Vibrio alginolyticus</i> GSCL29	DQ497399	100			3.28
1	<i>Vibrio harveyi</i> N8	DQ166244	99	6.69	14.22	
55	<i>Vibrio harveyi</i> CX08001	FJ605242	98			3.73
3	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SF11070701B	JQ904784	99	7.60	10.65	
12	<i>Vibrio ichthyenteri</i> strain HQ010223	DQ003270	99			2.10
24	<i>Vibrio ichthyenteri</i> strain H5	KC884596	99	6.24		
31	<i>Vibrio ichthyenteri</i> strain X32	KC884658	99			2.00
26	<i>Vibrio inusitatus</i> W21	DQ922921	98			1.50
25	<i>Vibrio natriegens</i>	FM999825	98			1.50
50	<i>Vibrio natriegens</i> C170	AB719184	98			3.01
4	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M2-31	KC210810	98	10.09	14.10	
38	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> XG409	DQ948037	100	5.23		2.34
35	<i>Vibrio penaeicida</i> DSM14	AJ421444	99			1.79
13	<i>Vibrio scophthalmi</i> D725	JF836195	99	5.24		3.20
18	<i>Vibrio splendidus</i>	AY620972	99	6.39	11.34	3.20
49	<i>Vibrio</i> sp B2-6	JX134442	99			2.34
54	<i>Vibrio</i> sp SB-E2 g	AB457052	100			3.51
8	Uncultured <i>Vibrio</i> sp P-F2	HQ897566	97	4.72	5.89	
14	Vibrionaceae bacterium P_C4	FJ178096	99	9.92		3.73
33	Vibrionaceae bacterium P_C5	FJ178091	100			1.79
Mollicutes						
47	<i>Mycoplasma iowae</i> ATCC 33552	JN935877	99			2.06
16	Uncultured mycoplasma	DQ340196	100			3.20
Actinobacteria						
27	Uncultured actinobacterium SC3-RK190	FM206234	98			2.00
58	<i>Brevibacterium salitolerans</i> TRM415	GU117109	98			3.24
Acidobacteria						
34	Uncultured acidobacteria	FM206243	100			2.78
Firmicutes						
46	<i>Candidatus</i> Arthromitus	DQ857141	100			2.34
57	<i>Bacillus aquimaris</i>	AB262736	99			3.88
30	<i>Lactobacillus fermentum</i> 3F9	AM117178	98			2.00
Unidentified microorganisms						
6	Uncultured bacterium EXO15432	FM242723	99	7.60		
9	Uncultured bacterium NT4_C27	HM630215	100	8.06	5.89	
10	Uncultured bacterium YO00334E05	FJ835362	100	4.55		
17	Uncultured bacterium RMAM1304	HQ320228	98	5.07		
21	Mucus bacterium	AY654783	97		9.03	2.90
37	Uncultured bacterium BR01AH03	DQ857155	99			1.79
44	Uncultured bacterium BR01AD06	DQ857141	97			3.79
48	Uncultured bacterium abc29f08.x1	JX134442	99			2.34
51	Uncultured bacterium EXO15432	FM242723	97			2.73

fish that were fed with OTC + SpPdp11 also presented an increase in the transcription of the other genes that were previously mentioned. However, the increases registered in the OTC + SpPdp11 group were significantly lower for TF and NADPHox genes and significantly higher for HAMP-1, GP96, and IGF-β genes than were those detected in the OTC group. In addition, OTC + SpPdp11 fish showed a significant increase in the transcription of HSP70, NKEF and GPx.

3.3. Principal Components Analysis (PCA)

The results of PCA were used to evaluate the relationship between the status of the intestinal microbiota and the liver gene expression of the Senegalese sole juveniles under the three treatments assayed and are represented in Fig. 4. Two principal

components account for 75.51% of the total data variability and clearly split microbial bands and expression of genes into two groups along the first PCA axis, F1 (Fig. 4A). The F1 component was responsible for 61.42% of the variance and was related to the presence or absence of the probiotic in the treatment. In this context, a positive correlation ($\geq 75\%$) was detected for bands that were present only in the DGGE patterns of OTC + SpPdp11 fish, the expression of NKEF, IGF-β, HAMP-1, HSP70 and GP96 genes with the F1 component. On the contrary, a clear negative correlation between the F1 component and bands sequenced from the intestinal microbiota of control and OTC fish and CASPASE-6 gene expression was established (Fig. 4A). In these last specimens, the intensity of the bands was higher than it was in fish from the control group. In addition, a close relationship between a group of intestinal microbiota and the transcription of HSP90AB gene was

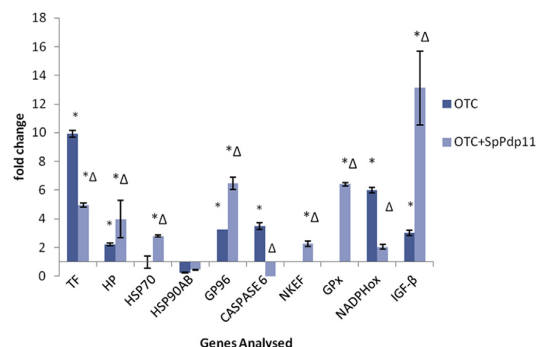


Fig. 3. Relative expression levels of the TF, HAMP-1, HSP70, HSP90AB, GP96, CASPASE-6, NKEF, GPx, NADPHox, and IGF- β genes in the liver of *Solea senegalensis* specimens fed for 10 days with commercial diet (control group), commercial diet with 40 mg kg⁻¹ OTC (OTC group), commercial diet with 40 mg kg⁻¹ OTC and 10⁹ CFU of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 g⁻¹ feed (OTC + SpPdp11 group). Data are expressed as the mean fold difference (mean SEM, n = 4) from the control group. Values with asterisks are significantly different from the control specimens ($p < 0.05$), whereas values with Δ denote significant differences ($p < 0.05$) between the OTC and OTC + SpPdp11 groups.

only detected in the control specimens (Fig. 4A). In summary, fish that received control and OTC supplemented diets were split into two groups, whereas specimens from the control and OTC groups scored negative and fish fed with the OTC + SpPdp11-supplemented diet scored positive on the F1 axis (Fig. 4B).

4. Discussion

Microbial ecosystem function and stability are influenced by species and functional group richness [46], which, together with biodiversity, are essential in protecting ecosystems against the decline of their functionality [47]. According to the DGGE band patterns obtained in our study, a shift in the intestinal microbiota composition was produced in sole juveniles treated only with OTC compared with control specimens, which showed greater similarity in DGGE patterns. In addition, the richness and Shannon's index values obtained from intestinal microbiota of fish treated with OTC decreased compared with those of the control group, as expected. Our results are in accordance with those reported by Navarrete et al. (2008) [20], who observed changes in the DGGE profiles and a decrease in the diversity of the intestinal microbiota of Atlantic

salmon (*S. salar*) treated with OTC. These differences may indicate ecological shifts in the bacterial communities. Although this does not imply low functional organisation, it might indicate a long recovery period before environmental changes are produced [48]. It is noteworthy that the effects induced by OTC were lessened by the simultaneous administration of SpPdp11 and that the diversity values increased compared with those observed in fish from both the control and OTC groups.

In this study, the most frequent phylogenetic group sequenced in all of the experimental groups was γ -Proteobacteria, and the *Vibrio* genus showed the highest percentage of intensity of the bands, particularly in those specimens treated only with OTC. γ -Proteobacteria and *Vibrio* genus have already been reported to be the most frequent bacterial groups detected in farmed *S. senegalensis* [49,30].

Fish that received dietary OTC and probiotics showed a significantly decreased intensity of bands related to the *Vibrio* genus and a higher diversity of γ -Proteobacteria compared with the intestinal microbiota of control and OTC-treated fish. This reduction may be related to the microbial changes that were induced by probiotics on the intestinal microbiota of these specimens. In this context, bands related to *Lactobacillus* and *Shewanella* genera were only sequenced in the OTC + SpPdp11 group. As demonstrated previously, *Lactobacillus* strains [50–52] and different species of *Shewanella* genus [53–55] have antagonistic abilities affecting *Vibrio* species. Some authors have reported mucine binding proteins and the antimicrobial activity of *L. fermentum* [56–58]. In addition, the *Shewanella* genus has been demonstrated to reduce the presence of *Vibrio* in the intestinal microbiota of *S. senegalensis* [59]. Finally, bands related to Firmicutes, Mollicutes and other bacterial groups were only detected in OTC + SpPdp11 fish.

Regarding the effect of OTC and OTC + SpPdp11 on Senegalese sole liver gene expression, a significant increase in the expression of the NADPH oxidase gene was detected in both experimental groups compared with the control. The results showed a significantly higher up-regulation of NADPH oxidase gene transcription in OTC fish compared with the OTC + SpPdp11 specimens. NADPH oxidase activity is directly involved in reactive oxygen species (ROS) production [60,61] and, consequently, in the triggering of oxidative stress, which leads to cell death [62,63]. In this way, the simultaneous administration of SpPdp11 with OTC might exert a protective effect on the hepatocytes of sole juveniles that are treated with antibiotics.

The CASPASE-6 gene encodes a protein member of the cysteine-aspartic acid protease family, which has a crucial role in the triggering of apoptosis induced by stressor agents [64,65]. In our study,

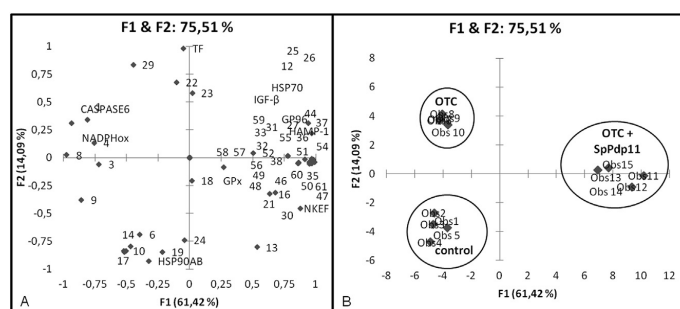


Fig. 4. Principal component analysis (PCA) applied to evaluate the relationship between the components of the intestinal microbiota and gene expression. Distribution of the variables (A) and *Solea senegalensis* specimens (B) along the F1 and F2 axes. Fish were fed commercial diet (control), commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC (OTC) or commercial diet supplemented with 40 mg kg⁻¹ OTC and 10⁹ CFU of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 g⁻¹ feed (OTC + SpPdp11).

a significant increase in CASPASE-6 gene transcription was detected in the liver of fish that received only OTC. On the contrary, the diet supplementation with SpPdp11 (OTC + SpPdp11 diet) significantly reduced the CASPASE-6 transcription levels compared with the other two groups studied. In this context, probiotic SpPdp11 administration might decrease the cellular damage related to the antibiotic supply.

Changes in intestinal microbiota composition might induce the translocation of microorganisms, or their products, into portal circulation and allow them access to the liver, where they can cause tissue damage [66] and dysfunctions. The portal system receives blood from the gut and thus activates liver functions [67]. Meanwhile, the liver exerts its influence secreting bile into the intestinal lumen [68]. There is increasing evidence of the existence of a correlation between intestinal microbiota and liver diseases [67,69,70]. In this sense, the PCA carried out in this study demonstrated the existence of a clear relationship between the intestinal microbiota bands of control and OTC specimens and the expression of CASPASE-6 and NADPH oxidase genes in the liver. This result, which was more intense for OTC than for control fish, corroborated the existence of a relationship between gut microbiota and oxidative stress, as described by Qiao et al. (2013) [71]. This relationship could be attributed to OTC inducing the increase of microorganisms in sole intestinal microbiota related to the higher expression of NADPH oxidase and CASPASE-6 detected in the liver. In contrast, the intestinal microbiota of OTC + SpPdp11 specimens, together with the transcription of these same genes, showed a negative correlation regarding F1 of the PCA. In addition, important changes in the intestinal microbiota composition of these fish compared with the control and OTC-treated fish were detected. In this way, bands related to *Lactobacillus* genus were only detected in fish treated with OTC + SpPdp11, and it has been reported that different species of *Lactobacillus* show the ability to produce antioxidant molecules and reduce oxidative stress [72,73].

A close relationship between the transcription of genes such as NKEF, IGF- β , HSP70 and GP96 and the bands of the DGGE patterns of fish treated with OTC + SpPdp11 was also detected. An increase in the levels of mRNA expressed by the NKEF gene was detected in OTC + SpPdp11 specimens. This gene encodes the natural killer cell enhancing factor protein, which is included in peroxiredoxin, a family of antioxidant enzymes that protect cells against oxidative damage [74], cell death and tissue repair after injury [75]. The up-regulation of this gene has been reported by LPS treatment or pathogens such as bacteria, viruses and parasites [76–78] and suggests that the gene plays a primary role in the innate immune response against bacterial and viral agents [79]. The IGF- β gene encodes for the IGF- β protein, which is a potent inhibitor of apoptosis [80,81] and improves the outcome in the murine sepsis model [82] and hepatic bacterial clearance, likely due to decreased Kupffer cell apoptosis [83]. Furthermore, the decreased translocation of bacteria across the gut after IGF- β therapy has been reported in models of liver injury [84]. An inverse correlation between the IGF- β levels and enteric bacterial load has also been observed in humans, which suggests that reduced IGF- β levels may play a role in the development of bacterial translocation [83].

Cell exposure to environmental stress conditions, including oxidation, frequently causes endoplasmic reticulum stress [85] and unfolding protein response in cells. This fact induces the expression of heat shock proteins (HSP) such as HSP70 and HSP90AB and consequently increases protein folding [86]. In this study, the expression of genes encoding HSP70 and HSP90AB was not altered in the liver of fish fed OTC. In contrast, OTC + SpPdp11 fish showed an up-regulation of HSP70 gene transcription. HSP70 family is key to maintaining protein homeostasis and signalling pathways [87] and to regulating fundamental cellular events that promote the

survival of cells that are exposed to different stressors [86]. In this context, the up-regulation of HSP70 has been related to the reduction or inhibition of apoptosis in different cellular types [88]. This effect could be related to the antioxidant defences promoted by HSP70 [15,89].

Treating fish with OTC, especially with OTC + SpPdp11, resulted in increased GP96 gene transcription. The GP96 gene product, which is an endoplasmic reticulum heat shock protein, interacts specifically with receptors on the surface of antigen presenting cells and induces immunity when it is released during stress and cell necrosis [90]. Different studies have shown the role that HSPs play in liver regeneration [91,92] and their implications in immunoregulatory effects [93,94]. In addition, the fish that were fed the diet supplemented with OTC + SpPdp11 showed a significant increase in the transcription of the GPx gene, which encodes the protein glutathione peroxidase. However, the correlation between the transcription of this gene and the composition of the intestinal microbiota was not as clear as it was in the case of the aforementioned genes. GPx, similar to other enzymes such as catalase and superoxide dismutase, regulates the cell oxidative status. Our results are in agreement with those showing increases in the expression of this gene in the cephalic kidney of *Gadus morhua* and *Epinephelus coioides* specimens that received a diet supplemented with *Pseudomonas* and *Psychrobacter* [95] and *Lactobacillus plantarum* [96], respectively. The improvement of the transcription of this gene could be considered protective against the effects of reactive oxidative ions (ROIs) [97] and could prevent the peroxidation of molecules such as lipids. These results could corroborate the anti-oxidative capability of SpPdp11 reported by Esteban et al. (2014) [98] and support a reduction of apoptosis.

Iron is an essential element for organisms that, under physiological conditions, is associated with a protein to prevent tissue damage. Its concentration must be regulated because disturbances of iron homeostasis have been involved in infectious disease pathogenesis [99]. In this study, the up-regulation of the TF gene in the liver was observed in specimens fed with OTC. This gene encodes for transferrin, which is an iron chelator protein that is involved in the defence mechanisms by reducing the availability of iron [100,101]. The up-regulation of this gene could be related to the iron-chelating activity of OTC and tetracycline family, as described by Grenier et al. (2000) [102]. In this way, increases in TF gene transcription could indicate an adaptation of the system in response to the reduction of iron availability for liver cells. Several studies have reported that the reduction of iron availability induces apoptosis in cells [103–105] and could be related to the increased expression of the CASPASE-6 gene that was observed in OTC-treated fish. The simultaneous administration of antibiotics and probiotics (OTC + SpPdp11) also induced the up-regulation of TF gene, although it was not as high as that observed in fish treated only with OTC. In contrast, hepcidin (HAMP-1) is a peptide that is present in serum but is synthesised predominantly by hepatocytes and represents the key peptide, which modulates iron homeostasis in the body [106,107]. In this study, an increase in the hepcidin gene transcription was detected in the liver of fish from the OTC and, in particular, the OTC + SpPdp11 groups. The higher HAMP-1 gene transcription observed in OTC + SpPdp11 fish could be related to the lower level of expression of CASPASE-6 gene related to apoptosis. On the contrary, the higher CASPASE-6 gene transcription detected in OTC fish was related to a lower HAMP-1 gene expression. In agreement with this assumption, it has been reported that the silencing of hepcidin enforced apoptosis in iron-induced human cardiomyocytes [108]. Hepcidin is a multifunctional peptide that is also involved in immunomodulatory functions as an antimicrobial peptide [109,110]. Several authors have reported that the hepcidin levels are significantly increased in fish after bacterial challenges [111–113].

However, the existence of at least two types of hepcidin is proposed in fish such as turbot; both types of hepcidin were affected by pathogen challenge, but only one (type 1) was up-regulated after iron overloading [113]. This type of hepcidin, HAMP-1, has been described in *S. senegalensis*, and its encoding gene transcription is down-regulated by stress [114,115]. From this perspective, the up-regulation detected in this study could be considered a potential immunostimulatory activity exerted by SpPdp11, especially when considering the absence of pathogenicity and the benefits produced by this microorganism on the immunology and physiology of *S. senegalensis* [116,117,118,119].

In summary, the results obtained in this study demonstrate that the administration of OTC increased the expression of genes related to apoptosis but that the joint administration of OTC and *S. putrefaciens* Pdp11 induced the up-regulation of genes related to antiapoptotic effects and oxidative stress regulation. An important modulation of the intestinal microbiota of *S. senegalensis* specimens was observed in both cases. In conclusion, a clear correlation between these changes and those detected in liver gene expression was established. However, further work should be performed to study the benefits of joint administration of probiotics and antibiotics for industrial aquaculture purposes.

Acknowledgements

This work has been supported by projects of Ministerio de Economía y Competitividad (grant no. AGL2011-30381-C03-02 and AGL2011-30381-C03-01), Fundación Séneca de la Región de Murcia (Grupo de Excelencia 04538/GERM/06) and Junta de Andalucía and FEDER (P10 RNM 6338).

References

- [1] T.X. Le, Y. Muneke, Residues of selected antibiotics in water and mud from shrimp ponds in mangrove areas in Viet Nam, *Mar. Pollut. Bull.* 49 (2004) 922–929.
- [2] T.X. Le, Y. Muneke, S. Kato, Antibiotic resistance in bacteria from shrimp farming in mangrove areas, *Sci. Total Environ.* 349 (2005) 95–105.
- [3] F.C. Cabello, Heavy use of prophylactic antibiotics in aquaculture: a growing problem for human and animal health and for the environment, *Environ. Microbiol.* 8 (2006) 1137–1144.
- [4] K. Haya, L.E. Burridge, B.D. Chang, Environmental impact of chemical wastes produced by the salmon aquaculture industry, *ICES J. Mar. Sci.* 58 (2001) 492–496.
- [5] A.B. Boxall, L.A. Fogg, P.A. Blackwell, P. Kay, E.J. Pemberton, A. Croxford, Veterinary medicines in the environment, *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 180 (2004) 1–91.
- [6] F.C. Cabello, Antibiotics and Aquaculture. An Analysis of Their Potential Impact upon the Environment, Human and Animal Health in Chile, Fundación Terram. Análisis de Políticas Públicas, 2000, pp. 1–16. No. 17.
- [7] H. Sørum, Farming of Atlantic salmon – an experience from Norway, *Acta Vet. Scand. Suppl.* 93 (2000) 129–134.
- [8] H. Sørum, Antimicrobial drug resistance in fish pathogens, in: F.M. Aarestrup (Ed.), *Antimicrobial Resistance in Bacteria of Animal Origin*, American Society for Microbiology Press, Washington, DC, USA, 2006, pp. 213–238.
- [9] M. Furushita, T. Maeda, H. Akagi, M. Ohta, T. Shiba, Analysis of plasmids that can transfer antibiotic resistance genes from fish farm bacteria to clinical bacteria, in: Abstracts, Joint Meeting of the 3 Divisions of the International Union of Microbiological Societies 2005. International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology, B-1162, 23–28 July 2005, San Francisco, CA, USA.
- [10] L. Poiriel, A. Liard, J.M. Rodriguez-Martinez, P. Nordmann, Vibronaceae as a possible source of Qnr-like quinolone resistance determinants, *J. Antimicrob. Chemother.* 56 (2005) 1118–1121.
- [11] F.C. Cabello, Antibiotics and aquaculture in Chile: implications for human and animal health, *Rev. Med. Chil.* 132 (2004) 1001–1006.
- [12] R. Goldberg, R. Naylor, Future seascapes, fishing and fish farming, *Front. Ecol. Environ.* 3 (2005) 21–28.
- [13] G. Rigos, I. Nengas, M. Alexis, Oxytetracycline (OTC) uptake following bath treatment in gilthead sea bream (*Sparus aurata*), *Aquaculture* 261 (2006) 1151–1155.
- [14] D.A. Antonopoulos, S.M. Huse, H.G. Morrison, T.M. Schmidt, M.L. Sogin, V.B. Young, Reproducible community dynamics of the gastrointestinal microbiota following antibiotic perturbation, *Infect. Immun.* 77 (2009) 2367–2375.
- [15] J.J. Guo, M.C. Tung, H.N. Chou, I.C. Liao, In vitro and in vivo antibacterial activities of furazolidone, *J. Fish. Soc. Taiwan* 30 (2003) 121–129.
- [16] M.E. Yonar, S.M. Yonar, S. Silici, Protective effect of propolis against oxidative stress and immunosuppression induced by oxytetracycline in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, W.), *Fish Shellfish Immunol.* 31 (2011) 318–325.
- [17] F.A. Guardiola, I. Cerezuela, J. Meseguer, M.A. Esteban, Modulation of the immune parameters and expression of genes of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) by dietary administration of oxytetracycline, *Aquaculture* 334–337 (2012) 51–57.
- [18] T. Lunden, G. Bylund, Effect of sulfadiazine and trimethoprim on the immune response of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), *Vet. Immunol. Immunopathol.* 85 (2002) 99–108.
- [19] R.M. Reda, R.E. Ibrahim, E.N.G. Ahmed, Z.M. El-Bouhy, Effect of oxytetracycline and florfenicol as growth promoters on the health status of cultured *Oreochromis niloticus*, *Egypt J. Aquat. Res.* 39 (2013) 241–248.
- [20] P. Navarrete, P. Mardones, R. Opazo, R. Espejo, J. Romero, Oxytetracycline treatment reduces bacterial diversity of intestinal microbiota of Atlantic salmon, *J. Aquat. Anim. Health* 20 (2008) 177–183.
- [21] J.F. Rawls, B.S. Samuel, J.L. Gordon, Gnotobiotic zebrafish reveal evolutionarily conserved responses to the gut microbiota, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 4596–4601.
- [22] C.M. Moffitt, S.M.A. Mobin, Profile of microflora of the posterior intestine of Chinook salmon before, during, and after administration of rations with and without erythromycin, *N. Am. J. Aquac.* 68 (2006) 176–185.
- [23] S. Denev, Y. Staykov, R. Moutafchieva, B. Beev, Microbial ecology of the gastrointestinal tract of fish and the potential application of probiotics and prebiotics in finfish aquaculture, *Int. Aquac. Res.* 1 (2009) 1–29.
- [24] T.B. Clarke, K.M. Davis, E.S. Lysenko, A.Y. Zhou, Y. Yu, J.N. Weiser, Recognition of peptidoglycan from the microbiota by Nod1 enhances systemic innate immunity, *Nat. Med.* 16 (2010) 228–231.
- [25] D.L. Merrifield, A. Dimitroglou, A. Foey, S.J. Davies, R.T.M. Baker, J. Børgwald, M. Castex, E. Ringø, The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids, *Aquaculture* 302 (2010) 1–18.
- [26] S.K. Nayak, Role of gastrointestinal microbiota in fish, *Aquac. Res.* 41 (2010) 1553–1573.
- [27] A.E. Pérez-Cobas, A. Artacho, H. Knecht, M.L. Ferrús, A. Friedrichs, S.J. Ott, A. Moya, A. Latorre, M.J. Gosalbes, Differential effects of antibiotic therapy on the structure and function of human gut microbiota, *PLoS One* 8 (2013) e80201.
- [28] M. Teuber, Veterinary use of antibiotic resistance, *Curr. Opin. Microbiol.* 4 (5) (2001) 493–499.
- [29] I. García de la Banda, C. Lobo, J.M. León-Rubio, S.T. Tapia-Paniagua, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, X. Moreno-Ventas, L.M. Lucas, F. Linares, F. Arce, S. Arijo, Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, *Aquaculture* 306 (2010) 281–288.
- [30] S.T. Tapia-Paniagua, M. Chabrillón, P. Díaz-Rosales, I. García de la Banda, C. Lobo, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration, *Microb. Ecol.* 60 (2010) 310–319.
- [31] S.T. Tapia-Paniagua, S. Vidal, C. Lobo, M.J. Prieto-Alamo, J. Jurado, H. Cordero, R. Cerezuela, I. García de la Banda, M.A. Esteban, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease, *Fish Shellfish Immunol.* 41 (2014) 209–221.
- [32] M.A. Sáenz de Rodríguez, P. Díaz-Rosales, M. Chabrillón, H. Smidt, S. Arijo, J.M. León-Rubio, F.J. Alarcón, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, J.B. Cara, F.J. Moyano, Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858), *Aquac. Nutr.* 15 (2) (2009) 177–185.
- [33] G. Martínez, E.M. Shaw, M. Carrillo, S. Zanuy, Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood, *Biotechniques* 24 (1998) 138–139.
- [34] G. Muyzer, E.C. de Waal, A.G. Uitterlinden, Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 695–700.
- [35] C.J. Sanguinetti, E. Dias-Neto, A.J.G. Simpson, Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels, *Biotechniques* 17 (1994) 915–919.
- [36] R.E. Hicks, R.I. Amann, D.A. Stahl, Dual staining of natural bacterioplankton with 4',6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 2158–2163.
- [37] M.D. Kane, L.K. Poulsen, D.A. Stahl, Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 682–686.
- [38] J.P. Gray, R.P. Herwig, Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments, *Appl. Environ. Microbiol.* 62 (1996) 4049–4059.
- [39] S.F. Altschul, W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, D.J. Lipman, Basic local alignment search tool, *J. Mol. Biol.* 215 (3) (1990) 403–410.
- [40] M.J. Prieto-Alamo, N. Abril, I. Osuna-Jiménez, C. Pueyo, *Solea senegalensis*

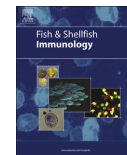
- genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time-PCR, *Aquat. Toxicol.* 91 (2009) 312–319.
- [41] L. Benedito-Palos, A. Saera-Vila, J.A. Calduch-Giner, S. Kaushik, J. Pérez-Sánchez, Combined replacement of fish meal and oil in practical diets for fast growing juveniles of gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.): networking of systemic and local components of GH/IGF axis, *Aquaculture* 267 (2007) 199–212.
 - [42] I. Osuna-Jiménez, T.D. Williams, M.J. Prieto-Álamo, N. Abril, J.K. Chapman, C. Pueyo, Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis* stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays, *Fish Shellfish Immunol.* 26 (2009) 699–706.
 - [43] M. Teles, S. MacKenzie, S. Boltana, A. Callol, L. Tort, Gene expression and TNF- α secretion profile in rainbow trout macrophages following exposures to copper and bacterial lipopolysaccharide, *Fish Shellfish Immunol.* 30 (1) (2011) 340–346.
 - [44] C. Infante, M.P. Matsuoka, E. Asensio, J.P. Cañavate, M. Reith, M. Manchado, Selection of housekeeping genes for gene expression studies in larvae from flatfish using real-time PCR, *BMC Mol. Biol.* 9 (2008) 28–40.
 - [45] K.J. Livak, T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, *Methods* 25 (2001) 402–408.
 - [46] T. Bell, J.A. Newman, B.W. Silverman, S.L. Turner, A.K. Lilley, The contribution of species richness and composition to bacterial services, *Nature* 436 (2005) 1157–1160.
 - [47] L. Wittebolle, M. Marzorati, L. Clement, A. Balloi, D. Daffonchio, K. Heylen, P. De Vos, W. Verstraete, N. Boon, Initial community evenness favours functionality under selective stress, *Nature* 458 (2009) 623–626.
 - [48] M. Marzorati, L. Wittebolle, N. Boon, D. Daffonchio, W. Verstraete, How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology, *Environ. Microbiol.* 10 (2008) 1571–1581.
 - [49] B. Martín-Antonio, M. Manchado, C. Infante, R. Zerolo, A. Labella, C. Alonso, J.J. Borrego, Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes, *Aquac. Res.* 38 (2007) 1213–1222.
 - [50] M. Chabrilón, S. Arijo, P. Díaz-Rosales, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, Interference of *Listonella anguillarum* with potential probiotic microorganisms isolated from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.), *Aquac. Res.* 37 (2007) 78–86.
 - [51] M. Chae-Woo, C. Yun-Seok, O. Kye-Heon, Removal of pathogenic bacteria and nitrogens by *Lactobacillus* spp. JK-8 and JK-11, *Aquaculture* 287 (2009) 266–270.
 - [52] M. Veerapagu, K.R. Jeya, N. Sivakumar, Effect of probiotic *Lactobacillus* sp on ornamental fish against pathogenic *Vibrio* sp, *Adv. Biotech.* 1 (2009) 20–22.
 - [53] M. Chabrilón, R.M. Rico, S. Arijo, P. Díaz-Rosales, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, Interactions of microorganisms isolated from gilthead seabream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup), *J. Fish Dis.* 28 (2005) 531–537.
 - [54] M. Chabrilón, R.M. Rico, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damseale* subsp *piscicida*, *J. Fish Dis.* 28 (2005) 229–237.
 - [55] S. Shakibzadeh, Roos Saad Che, M. Hafezieh, A. Christianus, M. Saleh Kamarudin, Kamaruzaman Sijam, A putative probiotic isolated from hatchery reared juvenile *Penaeus monodon*, *Iran. J. Fish Sci.* 11 (2012) 849–866.
 - [56] J.L. Balcázar, D. Vendrell, I. de Blas, I. Ruiz-Zarzuela, J.L. Múzquiz, O. Girones, Characterization of probiotic properties of lactic acid bacteria isolated from intestinal microbiota of fish, *Aquaculture* 278 (1–4) (2008) 188–191.
 - [57] M.E. Macías-Rodríguez, M. Zagorec, F. Ascencio, R. Vázquez-Juárez, M. Rojas, *Lactobacillus fermentum* BCS87 expresses mucus and mucin binding proteins on the cell surface, *J. Appl. Microbiol.* 107 (6) (2009) 1866–1874.
 - [58] E. Likotrafti, K.M. Tuohy, G.R. Gibson, R.A. Rastall, Development of antimicrobial synbiotics using potentially-probiotic faecal isolates of *Lactobacillus fermentum* and *Bifidobacterium longum*, *Anaerobe* 20 (2013) 5–13.
 - [59] S.T. Tapia-Paniagua, C. Lobo, X. Moreno-Ventas, I. García de la Banda, M.A. Morínigo, M.C. Balebona, Probiotic supplementation influences the diversity of intestinal microbiota during early stages of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858), *Mar. Biotechnol.* 16 (6) (2014) 716–728.
 - [60] S. De Minicis, D.A. Brenner, Oxidative stress in alcoholic liver disease: role of NADPH oxidase complex, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 23 (2008) S98–S103.
 - [61] Y.H. Paik, D.A. Brenner, NADPH oxidase mediated oxidative stress in hepatic fibrogenesis, *Korean J. Hepatol.* 17 (2011) 251–257.
 - [62] S. Ben Mkaddem, E. Pedruzzi, C. Werts, N. Coant, N. Bens, F. Cluzeaud, J.M. Goujon, E. Ogier-Denis, A. Vandewalle, Heat shock protein gp96 and NAD(P)H oxidase 4 play key roles in Toll-like receptor 4-activated apoptosis during renal ischemia/reperfusion injury, *Cell Death Differ.* 17 (2010) 1474–1485.
 - [63] A. Valencia, E. Sapp, J.S. Kimm, H. McClory, P.B. Reeves, J. Alexander, K.A. Ansong, N. Masso, M.P. Frosch, K.B. Kegel, X. Li, M. DiFiglia, Elevated NADPH oxidase activity contributes to oxidative stress and cell death in Huntington's disease, *Hum. Mol. Genet.* 22 (2013) 1112–1131.
 - [64] P.A. Olsvik, L.S. Heier, B.O. Roseland, H.C. Teien, B. Salbu, Effects of combined gamma-irradiation and metal (Al plus Cd) exposures in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.), *J. Environ. Radioact.* 101 (2010) 230–236.
 - [65] Y. Song, B. Salbu, L.S. Heier, H.C. Teien, O.C. Lind, D. Oughto, K. Petersen, B.O. Rosseland, L. Skipperud, K.E. Tollefsen, Early stress responses in Atlantic salmon (*Salmo salar*) exposed to environmentally relevant concentrations of uranium, *Aquat. Toxicol.* 112 (2012) 62–71.
 - [66] G. Szabo, S. Bala, J. Petrasek, A. Gattu, Gut liver axis and sensing microbes, *Dig. Dis.* 28 (6) (2011) 737–744.
 - [67] C. Cesaro, A. Tiso, A. Del Prete, R. Cariello, C. Tuccillo, G. Cotticelli, C. del Vecchio Blanco, C. Loguercio, Gut microbiota and probiotics in chronic liver diseases, *Dig. Liver Dis.* 43 (2011) 431–438.
 - [68] K. Norman, M. Pirlich, Gastrointestinal tract in liver disease: which organ is sick? *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care* 11 (2008) 613–619.
 - [69] R.K. Dhiman, Gut microbiota and hepatic encephalopathy, *Metab. Brain Dis.* 28 (2013) 321–326.
 - [70] M. Mouzaki, E.M. Comelli, B.M. Arendt, J. Bonengel, S.K. Fung, S.E. Fischer, I.D. McGilvray, J.P. Allard, Intestinal microbiota in patients with nonalcoholic fatty liver diseases, *Hepatology* 58 (2013) 120–127.
 - [71] Y. Qiao, J. Sun, Y. Ding, G. Le, Y. Shi, Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97 (2013) 1689–1697.
 - [72] N. Goyal, P. Eishi, G. Shukla, *Lactobacillus rhamnosus* GG antagonizes *Giardia intestinalis* induced oxidative stress and intestinal disaccharidases: an experimental study, *World J. Microbiol. Biotechnol.* 29 (2013) 1049–1057.
 - [73] A.R. Dijkstra, M.C. Setyawati, J.R. Bayjanov, W. Alkema, S.A.F.T. van Hijum, P.A. Bron, J. Hugenholtz, Diversity in robustness of *Lactobacillus lactis* strains during heat stress, oxidative stress and spray drying stress, *Appl. Environ. Microbiol.* 80 (2014) 603–611.
 - [74] S.G. Rhee, H.Z. Chae, K. Kim, Peroxiredoxins: a historical overview and speculative preview of novel mechanisms and emerging concepts in cell signalling, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 1543–1552.
 - [75] T. Ishii, E. Warabi, T. Yanagawa, Novel roles of peroxiredoxins in inflammation, cancer and innate immunity, *J. Clin. Biochem. Nutr.* 50 (2012) 91–105.
 - [76] J. Bethke, V. Rojas, J. Berendsen, C. Cárdenas, F. Guzmán, J.A. Gallardo, L. Mercado, Development of a new antibody for detecting natural killer enhancing factor (NKEF)-like protein in infected salmonids, *J. Fish Dis.* 35 (2012) 379–388.
 - [77] J. Chen, H.Q. Wu, H. Niu, Y.H. Shi, M. Li, Increased liver protein and mRNA expression of natural killer cell-enhancing factor B (NKEF-B) in ayu (*Plecoglossus altivelis*) after *Aeromonas hydrophila* infection, *Fish Shellfish Immunol.* 26 (2009) 567–571.
 - [78] G.H. Loo, D.L. Sutton, K.A. Schuller, Cloning and functional characterization of a peroxiredoxin 1 (NKEF A) cDNA from Atlantic salmon (*Salmo salar*) and its expression in fish infected with *Neoparamoeba perurans*, *Fish Shellfish Immunol.* 32 (2012) 1074–1082.
 - [79] M.A. Esteban, E. Chaves-Pozo, M. Arizcun, J. Meseguer, A. Cuesta, Regulation of natural killer enhancing factor (NKEF) genes in teleost fish, gilthead seabream and European sea bass, *Mol. Immunol.* 55 (2013) 275–282.
 - [80] Y. Jung, M. Miura, J. Yuan, Suppression of interleukin-1 beta-converting enzyme-mediated cell death by insulin-like growth factor, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 5112–5117.
 - [81] C.C. Matthews, E.L. Feldman, Insulin-like growth factor I rescues SHSY5Y human neuroblastoma cells from hyperosmotic induced programmed cell death, *J. Cell Physiol.* 166 (1996) 323–331.
 - [82] A. Ashare, A.B. Nymon, K.C. Doerschug, J.M. Morrison, M.M. Monick, G.W. Hunninghake, Insulin-like growth factor-1 improves survival in sepsis via enhanced hepatic bacterial clearance, *Am. J. Resp. Crit. Care* 178 (2008) 149–157.
 - [83] G.W. Hunninghake, K.C. Doerschug, A.B. Nymon, G.A. Schmidt, D.K. Meyerholz, A. Ashare, Insulin-like growth factor-1 levels contribute to the development of bacterial translocation in sepsis, *Am. J. Resp. Crit. Care Med.* 182 (2010) 517–525.
 - [84] C.D. Scopa, S. Koureleas, A.C. Tsamandas, I. Spiliopoulou, T. Alexandrides, K.S. Filos, C.E. Vagianos, Beneficial effects of growth hormone and insulin-like growth factor I on intestinal bacterial translocation, endotoxemia, and apoptosis in experimentally jaundiced rats, *J. Am. Coll. Surg.* 190 (2010) 423–431.
 - [85] V. Hernandez-Gea, M. Hilscher, R. Rozenfeld, M.P. Lim, N. Nieto, S. Werner, L.A. Devi, S.L. Friedman, Endoplasmic reticulum stress induces fibrogenic activity in hepatic stellate cells through autophagy, *J. Hepatol.* 59 (2013) 98–104.
 - [86] F. Zeng, C. Tee, M. Liu, V. Sherry, B. Dixon, B.P. Duncker, N.C. Bols, The p53/HSP70 inhibitor, 2-phenylethynylsulfonamide, causes oxidative stress, unfolded protein response and apoptosis in rainbow trout cells, *Aquat. Toxicol.* 146 (2014) 45–51.
 - [87] M.P. Mayer, B. Bukau, Hsp 70 chaperones: cellular functions and molecular mechanisms, *Cell. Mol. Life Sci.* 62 (2005) 670–684.
 - [88] J.H. Zhao, X.L. Meng, J. Zhang, Y.L. Li, Y.J. Li, Z.M. Fan, Oxygen glucose deprivation post-conditioning protects cortical neurons against oxygen-glucose deprivation injury: role of HSP70 and inhibition of apoptosis, *J. Huazhong Univ. Sci. Med. Sci.* 34 (2014) 18–22.
 - [89] P. Azad, J. Ryu, G.G. Haddad, Distinct role of Hsp70 in *Drosophila* hemocytes during severe hypoxia, *Free Radic. Biol. Med.* 51 (2011) 530–538.
 - [90] K. Schreiter, M. Hausmann, T. Spoettl, T.S. Strauch, F. Bataille, J. Schoelmerich, H. Herfarth, W. Falk, G. Rogler, Glycoprotein (gp) 96 expression: induced during differentiation of intestinal macrophages but impaired in Crohn's disease, *Gut* 54 (2005) 935–943.

- [91] F.D. Shi, L. Van Kaer, Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 751–760.
- [92] I. Mrakovčić-Šutić, H. Jakovac, M. Šimin, D. Grebić, M. Čuk, Z. Trobonjača, B. Radošević-Stašić, Heat shock protein-GP96 as an innate sensor of damage and activator of autoreactive NKT and regulatory T cells during liver regeneration, *Histol. Histopathol.* 23 (2008) 1111–1126.
- [93] G. Multhoff, Heat shock proteins in immunity, *Handb. Exp. Pharmacol.* 172 (2006) 279–304.
- [94] T. Warger, N. Hilf, G. Rechtsteiner, P. Haselmayer, D.M. Carrick, H. Jonuleit, P. von Landenberg, H.G. Rammensee, C.V. Nicchitta, M.P. Radsak, H. Schild, Interaction of TLR2 and TLR4 ligands with the N-terminal domain of Gp96 amplifies innate and adaptive immune responses, *J. Biol. Chem.* 281 (2006) 22545–22553.
- [95] C.C. Lazado, C. Marlowe, A. Caipang, S. Gallage, M.F. Brinchmann, V. Kiron, Expression profiles of genes associated with immune response and oxidative stress in Atlantic cod, *Gadus morhua* head kidney leukocytes modulated by live and heat inactivated bacteria, *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol.* 155 (3) (2010) 249–255.
- [96] V.M. Son, C.C. Chang, M.C. Wu, Y.K. Guu, C.H. Chiu, W. Cheng, Dietary administration of the probiotic, *Lactobacillus plantarum*, enhanced the growth, innate immune responses, and disease resistance of the grouper *Epinephelus coioides*, *Fish Shellfish Immunol.* 26 (5) (2009) 691–698.
- [97] C. Barata, I. Varo, J.C. Navarro, S. Arun, C. Porte, Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds, *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.* 140 (2) (2005) 175–186.
- [98] M.A. Esteban, H. Cordero, M. Martínez-Tomé, A.M. Jimenez-Monreal, A. Bakhrouf, A. Mahdhi, Effect of dietary supplementation of probiotics and palm fruits extracts on the antioxidant enzyme gene expression in the mucosae of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.), *Fish Shellfish Immunol.* 39 (2014) 532–540.
- [99] U. Georgopoulou, A. Dimitriadis, P. Foka, E. Karamichari, A. Mamalaki, Hepcidin and the iron enigma in HCV infection, *Virulence* 5 (2014) 465–476.
- [100] K.J. Palaksha, G.W. Shin, Y.R. Kim, T.S. Jung, Evaluation of non-specific immune components from the skin mucus of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*), *Fish Shellfish Immunol.* 24 (2008) 479–488.
- [101] C.M.A. Caipang, M.F. Brichmann, V. Kiron, Profiling gene expression in the spleen of Atlantic cod, *Gadus morhua*, upon vaccination with *Vibrio anguillarum* antigen, *Comp. Biochem. Physiol. B* 153 (2009) 261–267.
- [102] D. Grenier, M.P. Huot, D. Mayrand, Iron-chelating activity of tetracyclines and its impact on the susceptibility of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* to these antibiotics, *Antimicrob. Agents Chemother.* 44 (2000) 763–766.
- [103] B.T. Greene, J. Thorburn, M.C. Willingham, A. Thorburn, R.P. Planalp, M.W. Brechbiel, J. Jennings-Gee, J. Wilkinson, F.M. Torti, S.V. Torti, Activation of caspase pathways during iron chelator-mediated apoptosis, *J. Biol. Chem.* 277 (2012) 25568–25575.
- [104] T. Simonart, J.R. Boelaert, R. Mosselmans, G. Andrei, J.C. Noel, E. De Clercq, R. Snoeck, Antiproliferative and apoptotic effects of iron chelators on human cervical carcinoma cells, *Gynecol. Oncol.* 85 (2002) 95–102.
- [105] A. Cozzi, S. Levi, B. Corsi, P. Santambrogio, A. Campanella, G. Gerardi, P. Arosio, Role of iron and ferritin in TNF α -induced apoptosis in HeLa cells, *FEBS Lett.* 537 (2003) 187–192.
- [106] C. Beaumont, Molecular mechanisms of iron homeostasis, *Med. Sci.* 20 (2004) 68–72.
- [107] O. Loreal, M.B. Troadec, E. Camberlein, N. Fatih, M. Ropert, P. Brissot, Iron metabolism, *Rev. Prat.* 56 (2006) 2111–2117.
- [108] Y.P. Hsieh, C.H. Huang, C.Y. Lee, C.Y. Lin, C.C. Chang, Silencing of hepcidin enforces the apoptosis in iron-induced human cardiomyocytes, *J. Occup. Med. Toxicol.* 9 (2014), <http://dx.doi.org/10.1186/1745-6673-9-11> article 11.
- [109] I. De Domenico, T.Y. Zhang, C. Koenig, R.W. Branch, N. London, E. Lo, et al., Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine induced inflammatory responses in mice, *J. Clin. Invest.* 120 (2010) 2395e405.
- [110] V. Rajanbabu, C.Y. Pan, S.C. Lee, W.J. Lin, C.C. Lin, C.L. Li, J.Y. Chen, Tilapia hepcidin 2–3 peptide modulates lipopolysaccharide-induced cytokines and inhibits tumor necrosis factor- α through cyclooxygenase-2 and phosphodiesterase 4D, *J. Biol. Chem.* 285 (40) (2010) 30577–30586.
- [111] B. Martín-Antonio, R.M. Jiménez-Cantizano, E. Salas-Leiton, C. Infante, M. Manchado, Genomic characterization and gene expression analysis of four hepcidin genes in the red banded seabream (*Pagrus auriga*), *Fish Shellfish Immunol.* 26 (2009) 483–491.
- [112] J. Bo, L. Cai, J.H. Xu, K.J. Wang, D.W.T. Au, The marine medaka *Oryzias melastigm.* A potential marine fish model for innate immune study, *Mar. Pollut. Bull.* 63 (2011) 267–276.
- [113] P. Pereiro, A. Figueras, B. Novoa, A novel hepcidin-like in turbot (*Scophthalmus maximus* L.) highly expressed after pathogen challenge but not after iron overload, *Fish Shellfish Immunol.* 32 (2012) 879–889.
- [114] E. Salas-Leiton, V. Anguis, B. Martín-Antonio, D. Crespo, J.V. Planas, C. Infante, J.P. Cañavate, M. Manchado, Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response, *Fish Shellfish Immunol.* 28 (2010) 296–302.
- [115] E. Salas-Leiton, O. Coste, E. Asensio, C. Infante, J.P. Cañavate, M. Manchado, Dexamethasone modulates expression of genes involved in the innate immune system, growth and stress and increases susceptibility to bacterial disease in Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup, 1858), *Fish Shellfish Immunol.* 32 (2012) 769–778.
- [116] S.T. Tapia-Paniagua, P. Díaz-Rosales, J.M. León-Rubio, I. García de la Banda, C. Lobo, F.J. Alarcón, M. Chabrillón, P. Rosas-Ledesma, J.L. Varela, I. Ruiz-Jarabo, J.M. Mancera, Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.), *Aquac. Int.* 20 (6) (2012) 1025–1039.
- [117] S.T. Tapia-Paniagua, P. Díaz-Rosales, I. García de la Banda, C. Lobo, E. Clavijo, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms, *Aquaculture* 424–425 (2014) 234–238.
- [118] C. Lobo, X. Moreno-Ventas, S. Tapia-Paniagua, C. Rodríguez, M.A. Morínigo, I. García de la Banda, Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture, *Fish Physiol. Biochem.* 40 (2014) 295–309.
- [119] C. Lobo, S. Tapia-Paniagua, X. Moreno-Ventas, F.J. Alarcón, C. Rodríguez, M.C. Balebona, M.A. Morínigo, I. García de la Banda, Benefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*), *Aquaculture* 433 (2014) 183–195.



Contents lists available at ScienceDirect

Fish & Shellfish Immunology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/fsi

Full length article

The treatment with the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 of specimens of *Solea senegalensis* exposed to high stocking densities to enhance their resistance to disease



S.T. Tapia-Paniagua^a, S. Vidal^a, C. Lobo^b, M.J. Prieto-Álamo^c, J. Jurado^c, H. Cordero^d,
R. Cerezuela^d, I. García de la Banda^b, M.A. Esteban^d, M.C. Balebona^a, M.A. Morínigo^{a,*}

^a Universidad de Málaga, Departamento de Microbiología, Campus de Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain

^b Instituto Español de Oceanografía, Centro Oceanográfico de Santander, 39080 Santander, Spain

^c Universidad de Córdoba, Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, Campus de Rabanales, Ctra. Madrid, Km. 396, 14071 Córdoba, Spain

^d Universidad de Murcia, Departamento de Biología Celular e Histología, Campus de Espinardo s/n, 30100 Murcia, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 May 2014

Received in revised form

30 July 2014

Accepted 7 August 2014

Available online 19 August 2014

Keywords:

Solea senegalensis

Stress

Density

Probiotic

Pdp11

ABSTRACT

Aquaculture industry exposes fish to acute stress events, such as high stocking density, and a link between stress and higher susceptibility to diseases has been concluded. Several studies have demonstrated increased stress tolerance of fish treated with probiotics, but the mechanisms involved have not been elucidated. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 is a strain isolated from healthy gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) and it is considered as probiotics. The aim of this study was to evaluate the effect of the dietary administration of this probiotics on the stress tolerance of *Solea senegalensis* specimens farmed under high stocking density (PHD) compared to a group fed a commercial diet and farmed under the same conditions (CHD). In addition, during the experiment, a natural infectious outbreak due to *Vibrio* species affected fish farmed under crowding conditions. Changes in the microbiota and histology of intestine and in the transcription of immune response genes were evaluated at 19 and 30 days of the experiment. Mortality was observed after 9 days of the beginning of the experiment in CHD and PHD groups, it being higher in the CHD group. Fish farmed under crowding stress showed reduced expression of genes at 19 day probiotic feeding. On the contrary, a significant increase in immune related gene expression was detected in CHD fish at 30 day, whereas the gene expression in fish from PHD group was very similar to that showed in specimens fed and farmed with the conventional conditions. In addition, the dietary administration of *S. putrefaciens* Pdp11 produced an important modulation of the intestinal microbiota, which was significantly correlated with the high number of goblet cells detected in fish fed the probiotic diet.

© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Aquaculture is a highly competitive growth industry which, in the search for greater economic yields and increased production, exposes fish to acute stress events, such as the increase of the stocking density. Stress is a situation in which organisms are subjected to challenges that may result in a danger to their integrity [1]. Fish diseases constitute major limiting factors in aquaculture [2] and there is a strong link between stress and susceptibility to such diseases [3] based on close interactions between the stress-

immune system [1]. It has been shown that in most cases, diseases appear when animals have previously been exposed to a stress situation [1].

Contradictory results regarding the effects of high stocking densities on fish performance have been reported. Thus, whereas low growth has been observed for farmed halibut (*Paralichthys californicus*) [4] and Dover sole (*Solea solea*) [5] exposed to high stocking densities, a null effect on the growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) has been reported [6,7]. However, there is increasing evidence that social stressors such as crowding may exert immune suppression [1] and can significantly affect mucosal surface components of the gastrointestinal tract, the intestinal microbiota [8] and have an important effect on fish nutrition and host immunity [9,10]. Mucosal surfaces particularly in fish

* Corresponding author.

E-mail address: morinigo@uma.es (M.A. Morínigo).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>

1050-4648/© 2014 Elsevier Ltd. All rights reserved.

represent a potential route of entry for some pathogens [11,12], but although the relationship between the status of the intestinal microbiota with disease incidence has been previously suggested [13], there is scarce information about the modulation of the intestinal microbiota of fish reared at different stocking densities [14].

Several studies have demonstrated an improvement to stress tolerance in fish treated with probiotics [15–17] and the potential role of probiotic microorganisms in overcrowded stress situations has been evaluated in different animals including fish. In this context [18], reported positive effects on immunological response in nursery pigs stressed by reduced spaces and challenged with enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) K88⁺. In fish, *Shewanella putrefaciens* Pdp11, a probiotic strain isolated by us from farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.) and showing several probiotic characteristics [19], promoted growth and improved stress tolerance of gilthead seabream specimens cultured under high stocking density [20]. On the other hand [21], evaluated the effects of a probiotic strain of *Lactobacillus rhamnosus* on the crowding stress response of specimens of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*), reporting that the probiotics increased energy availability for metabolic support of the crowding stress response and improved the stress coping capacity of fish. The probiotic *S. putrefaciens* Pdp11 has also induced improved stress tolerance of gilthead seabream specimens exposed to high stocking densities [20]. There is little information concerning the responses of *S. senegalensis*, a flatfish in great demand in Southern European aquaculture markets [6], farmed under high stocking densities [7], and there is null information concerning the effect of this stressor on the intestine and the potential role played by probiotic microorganisms.

Fish have several protective mechanisms to prevent microbial entry through the gastrointestinal (GI) tract, including the production of mucus by goblet cells [22]. Disruption of the ecological equilibrium in the intestinal microbiota of the GI tract produces an increase in the permeability and alterations of the immune defences leading to a loss of the barrier function [22], and the possibility of bacterial translocation [23].

The aim of this study was to elucidate changes produced in the intestinal tract and the gene expression related to the immunological response of Senegalese sole specimens under high stocking density and receiving the dietary administration of the probiotic *S. putrefaciens* Pdp11, and the correlation that these factors could exert on their resistance to the disease.

2. Materials and methods

2.1. Microorganisms

S. putrefaciens Pdp11 isolated from healthy gilthead seabream skin was shown to be non-virulent for *S. senegalensis* (Kaup) and *Sparus aurata* (L.), and it is capable of counteracting adhesion of pathogens to fish surfaces as well as enhancing immune activities of gilthead seabream and Senegalese sole leucocytes [24–26]. In addition, *S. putrefaciens* Pdp11 increases growth rates of juvenile soles [27] and resistance against pathogens such as *Vibrio harveyi* and *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* [24–26,28]. For these reasons, it is considered a potential fish probiotics to be tested in farmed Senegalese sole and gilthead sea bream [19].

S. putrefaciens Pdp11 cells were cultured in tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 15 g l⁻¹ NaCl (TSBs) for 18 h at 22 °C, with continuous shaking, and appropriate dilutions of the cultures were spread onto tryptone soya agar (Oxoid Ltd, Hampshire, UK) plates supplemented with 1.5% NaCl (TSAs). Bacterial suspensions were prepared by cell scraping from the plates and washing in sterile phosphate-buffered saline (PBS,

pH 7.4). The number of culturable cells was determined by plate count on TSAs, and adjusted to 10¹¹ CFU ml⁻¹.

2.2. Fish treatments and natural infection

One hundred and forty healthy farmed Senegalese sole specimens (14.6 ± 0.7 g mean body weight) from the stocks of the Spanish Oceanographic Institute of Santander (IEO, Spain) were randomly distributed in 150-L seawater tanks connected to an open circulating system (35.4 g l⁻¹ salinity, 16.6 °C ± 0.5 °C), and with a renovation rate of 300% day⁻¹. They were acclimated for 2 weeks prior to the experimental period, and ten fish were sampled for bacteriology to check the health status of the stock. The specimens were dissected and samples of spleen, liver and kidney were cultured on TSAs at 22 °C for 48 h to detect the potential presence of microorganisms. Fish were fed eight times a day [29] with a commercial pellet diet Gemma 1.8 Diamont (18% total lipids and 55% crude protein, SKRETTING, Burgos, Spain). The initial fish weight was used to adjust the daily ration of feed according to the normal pattern in this species (20 g kg⁻¹).

After the acclimation period, fish were randomly distributed in eight tanks. The diet previously described was supplied to four tanks. Fish specimens were farmed under normal stocking density (7 kg m⁻²) in two tanks of each diet group (CND groups), whereas the stocking density in the other two tanks was higher (30 kg m⁻²) (CHD groups). The rest of the tanks received the commercial feed supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 bacterial cells. Ten millilitres of the bacterial suspension previously prepared were added to 90 ml of 0.5% (w/v) sodium alginate suspension (Sigma, Sigma–Aldrich, St Louis, MO, USA). The suspension was sprayed onto the feed following the methodology described by Ref. [30], to obtain a dose of 10⁹ CFU g⁻¹ feed which produces benefits in *S. senegalensis* [27].

Disease symptoms consisting in the presence of wounds on the skin and mortality started to be observed 9 days after the beginning of the experiment in fish groups maintained under high stocking density. Fish were not treated and a monitoring of the mortalities was carried out.

2.3. Sampling and processing of diseased fish

Moribund fish exhibiting hemorrhagic lesions on both body surfaces and pale livers were sampled for bacteriological analysis at days 9, 19 and 30. Samples from ulcers, head kidney and liver were cultured on TSAs and in TSBS. All inoculated media were incubated at 22 °C for 24 h, and the different colony types grown on the plates were picked and identified by the amplification and sequencing of a fragment of 16S rDNA. Briefly, this fragment was amplified using the universal primers SD-Bact-0008-a-S20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') and SD-Bact-1492-a-A-19 (5' GGT TAC CTT GTT ACG ACT T) [31]. Polymerase chain reactions were carried out in a 50 µl reaction mixture that included 5 pmol of each primer, 200 µM dNTPs, 1 × PCR buffer, 2 mM MgCl₂, 1 U BIOTAQ™ DNA Polymerase (Bioline, London, UK) and 1 µl of a boiled colony suspension. The PCR profile was as follows: 2 min at 95 °C and 35 cycles of 30 s at 95 °C, 30 s at 52 °C and 1.3 min at 72 °C and a final step of 5 min at 72 °C. Polymerase chain reaction products were electrophoresed on a 1% agarose gel and visualized via ultraviolet transillumination. Following the PCR reaction, unconsumed dNTPs and primers were removed using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Mannheim, Germany). The PCR products were sent to Macrogen Inc. (Korea) for their sequencing, using SDBact-0008-a-S20 and SD-Bact-1492-a-A-19 as sequencing primers. The sequences were aligned to the closest relative in the GenBank database using BLAST.

2.4. Analysis of the intestinal microbiota

The individual intestines of three specimens from each tank (six per treatment) were sampled at days 0, 19 and 30. Intestinal contents were collected with 1 ml PBS, pH 7.2, and a 1 mL aliquot was centrifuged at $1000\times g$ for 5 min. Total DNA was extracted from each sample as described by Ref. [32]. Pure culture of the probiotic strain *S. putrefaciens* Pdp11 was grown to exponential phase in TSBs, and then centrifuged at $2500\times g$ for 15 min. Pellets were washed with PBS and used for DNA extraction following Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA) instructions. DNA was amplified using the 16S rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F (5'-GAACGCGAAGAACCTTAC-3') and 1401-R (5'-CGGTGTGTACAAGACCC-3'). Primer 968-GC-F carries a 35 bp GC clamp. PCR mixtures and conditions to perform PCR were those previously described by Ref. [30]. The amplicons obtained were separated by Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) according to the specifications of [33] using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The gels were subsequently stained with AgNO_3 [34].

DGGE banding patterns were analysed using FPQuest Software version 4.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A matrix of similarities for the densitometric curves of the band patterns was calculated using the Bray–Curtis index. Clustering of DGGE patterns was achieved by construction of dendrograms using the Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Averages (UPGMA). Structural diversity of the microbial community was determined by an analysis of the DGGE-patterns. Species richness (R) was calculated based on the total number of bands, and Shannon index (H') was also calculated following the function: $H' = -\sum P_i \log P_i$, where P_i is defined as (n_i/N) , n_i is the peak surface of each band, and N is the sum of the peak surfaces of all bands.

2.5. Cloning of the PCR amplified products

DNA was extracted and PCR performed with a Taq DNA polymerase kit from Life Technologies. The forward primer S-D-Bact-0008-aS-20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') [35], which targets the domain Bacteria, and the reverse primer S*-Univ-1492-b-A-21 (59ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') [36] which amplifies the bacterial 16S rDNA were used. Amplification was carried out as described by Ref. [37]. Reaction tubes contained 100 ng total DNA, 1.25 U Taq DNA polymerase (from Life Technologies), buffer, 2.5 mM MgCl_2 , 200 mM each deoxyribonucleotide triphosphate, and 10 μM each primer in a final volume of 50 μL . Initial DNA denaturation and enzyme activation steps were performed at 94°C for 10 min in an Eppendorf thermocycler, followed by 30 cycles denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min 30 s, followed by final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were purified and concentrated with High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche) according to the manufacturer instructions. Purified PCR product was cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA). Ligation was performed at 4°C overnight followed by transformation into competent *Escherichia coli* JM109. One hundred colonies of ampicillin-resistant transformants from each diet and day sampled were transferred with a sterile toothpick to 100 μL TE buffer and boiled for 10 min at 95°C . Immediately, PCR was performed with pGEMT-specific primers T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3') and SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'). Plasmids containing an insert were used to amplify V6–V8 region of 16S rDNA. The amplicons were compared with the bands of DGGE patterns and used for sequence analysis (Macrogen Korea sequencing). They were compared with the sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) using the BLAST sequence algorithm [38]. Database sequences showing the highest correlation were used to infer identity.

2.6. Statistical analysis

Bray–Curtis similarity index was calculated based on DGGE densitometric curves and used for cluster analysis (UPGMA method) and Non Metric Multidimensional (NMDS) plots. An analysis of similarities (ANOSIM) to test for significant differences between control and treatment groups was carried out using PAST version 2.17 software [39]. The contribution of clones identified from cloning experiments to similarity percentages (SIMPER) between control and treatment groups was determined using PAST software. The significance of differences of the Shannon index (H'), and species richness (R) values was determined after performing analysis of variance (ANOVA) with XLSTAT 2013 software (Addinsoft, Madrid, Spain).

Kruskal–Wallis test was used to test the significance of the differences in species richness (R) and species diversity (H') using the program STATGRAPHICS Plus 5.0 (Statgraphics Corporation, Rockville, MD, USA). Principal Components Analysis (PCA) was applied to correlate variables determined in the liver of fish fed assayed diets and microbial species detected in the intestinal microbiota using XLSTAT 2012 software (Addinsoft, Madrid, Spain) and orthogonal transformation (Varimax).

2.7. Absolute transcript quantification by real-time RT-PCR

The livers of at least five specimens per treatment at days 0, 19 and 30 were dissected, individually frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C . Total RNA was extracted from individual livers, using TRIzol reagent (Invitrogen, Spain) according to manufacturer instructions. Genomic DNA contamination was avoided by subsequent cleanup with RNeasy reagents (Qiagen Inc., CA, USA). RNA quality was checked using an Agilent 2100 bioanalyzer and quantification was done spectrophotometrically. cDNA was generated from 2 μg of total RNA from each sample, using the M-MLV reverse transcriptase (Life Technologies SA, Spain) and random hexamers (Invitrogen, Spain). For quantifications on pooled samples, one RNA pool was prepared for each experimental condition by combining equal amounts of the individual RNA samples before retrotranscription.

Absolute real-time qRT-PCR was performed as described by Ref. [40]. Primers directed against the selected genes were as described previously in Ref. [40] (NCCRP1, C3, C7, and HP) and [41] (HAMP1, TNFAIP9, and NARS) or designed with the Oligo 6.1 software (Molecular Biology Insights), as detailed in Ref. [42] (LYZ, HSP90AB and HSP70) (Supplementary Table 1). To obtain high specificity and performance, primers were required to have high T_m ($\geq 80^\circ\text{C}$), optimal $3\text{-}\Delta G$ ($\geq -3 \text{ kcal mol}^{-1}$) value, and to be hairpin and duplex free. All primer pairs produced amplicons of the predicted size.

Real-time PCR reactions, both on pooled or individual samples, were performed in quadruplicate using 50 ng of cDNA template, 0.3 μM of each primer, 3 mM MgCl_2 , 250 μM of each dNTP, 0.75 units of Platinum Taq DNA polymerase, and 1:100,000 SYBR Green I dye (Roche, Spain) in a volume of 25 μL . Reactions were analysed on an CFX96 Real-Time PCR System (BioRad, Life Technologies SA, Spain). Cycling conditions were as follows: 2 min at 95°C for the Platinum Taq activation and 40 cycles for the melting (15 s, 95°C) and annealing/extension (30 s, 70°C) steps. Following denaturation at 95°C for 15 s, and cooling to 60°C for 30 s, a melt curve (T_m) was generated by heating from 60°C to 95°C with 0.5°C increments, 10 s dwell time and fluorescence read at each temperature. The specificity of the reactions was confirmed by the T_m curves, which were consistently specific for the amplified products. No primer dimers were detected and all PCR products were further verified by nucleotide sequencing. Replicate PCR reactions

generated highly reproducible results with S.E.M. < 10% of the mean (<1% for threshold cycle). The reliability of an absolute quantification depends on identical amplification efficiencies for both the target and the calibrator. All primers amplified with the same optimal PCR efficiency (~100%) in the range of 20 to 2×10^5 pg of total RNA input with high linearity ($r \geq 0.98$) (Supplementary Table 1) [40,41]. The number of transcript molecules was calculated from the linear regression of the absolute calibration curve ($y = -3.326x + 39.693$; 100% efficiency), as described previously by Refs. [43,44].

2.8. Light microscopy study

For light microscopy (LM) study, samples of anterior intestine were fixed in fresh 10% neutral buffered formalin at room temperature for 24 h. After serial dehydration steps in alcohol, samples were embedded in hydrophilic resin JB-4 according to routine procedures. Sections were cut at 3 μ m (Microm), mounted on silane-covered (TESPA, 3-aminopropyl-triethoxy-silane; Sigma, Spain) glass slides, and stained with haematoxylin and eosin (HE) for histological analysis. Sections were also stained for neutral and acid mucins using Alcian blue (AB) and periodic acid-Schiff (PAS) [45].

2.9. Histological screening and intestinal morphometry

The effects of dietary treatments were monitored by LM in terms of loss of epithelial integrity, presence of cell debris in the lumen, villus height, presence of goblet cells, intraepithelial and lamina propria leucocytes, villus and wall intestinal areas, microvilli disorganization/disruption, and oedema. Computerised morphometric measurements were made of the following: (1) villus height (Vh, μ m, measured from the tip to the base of villus) and intestinal diameter (Id, μ m), (2) number of goblet cells per area of epithelium layer (total, PAS+ and PAS + AB+), (3) intra-epithelial leucocytes (IELs) and lamina propria leucocytes (LPLs), and (4) lumen, villus, and wall areas. The Vh was corrected to Id to take into account the variations which may occur due to increased intestinal diameter. For this, ratio Id/Vh was calculated for all the samples. These measures were made using MIP 4.5 image analysis software (Consulting Image Digital, Spain) and NewCAST software (Visiopharm, Hoersholm, Denmark). Images were obtained with Leica 6000B microscopy equipped with a Leica DFC280 camera and Leica Application Suite V 2.5.0 R1 acquisition software (Leica Microsystems SLV, Spain). Results were expressed as mean values with their standard errors.

The signs observed were assessed against arbitrary units in order to obtain numerical data that would enable us to statistically analyse the observed differences with respect to control samples. Each change received an arbitrary score from 0 to 3: 0—none/normal, 1—mild, 2—moderate, and 3—marked. Total anterior intestine scores were classified as: 0–1, normal; 1–3, moderate pathological changes; >3–6 severe pathological change [46,47].

3. Results

3.1. Bacterial infection

Fish exposed to high stock density conditions showed darkness and wounds on the skin (Supplementary Fig. 1) one week after stocking and starting feeding treatment. The intensity of the symptoms was higher in CHD fish compared to PHD specimens. Mortality was detected in the CHD group from day 9 of the experiment, reaching 40% after 30 days, whereas mortality in the PHD group was below 5% (Fig. 1) and it stopped at 11 day of the

experiment. Only two different types of colonies on TSAs identified as *V. harveyi* (HM584117) and *Vibrio parahaemolyticus* (JK134442 and KC210810) were isolated by bacteriological analysis of internal organs, whereas they were the predominant colony types from wounds sampled.

3.2. Effect of stocking density on intestinal microbiota

Cluster analysis was carried out using UPGMA methods based on the Bray–Curtis similarity of densitometric DGGE bands obtained at 19 and 30 days (Fig. 2). Clusters grouping specimens based on the diet and sampling day were observed both in fish exposed to normal and high stocking densities. The percentage of similarity among the specimens of both diet groups was very high (>80%). Similar results were visualized in NMDS plots (Fig. 3) showing significant differences ($p < 0.01$) in the intestinal microbiota among groups receiving the control and the probiotic diets at different days and exposed to different stocking densities. Ecological parameters summarized in Table 1 indicate that high stocking densities significantly ($p < 0.05$) reduced the richness (R) and the Shannon's diversity index (H') in the DGGE patterns, this reduction being more marked when the specimens received the probiotic diet for 30 days.

One hundred clones were sequenced from each experimental group assayed and the closest relatives as determined by comparative 16S rDNA sequence analysis are summarized in Table 2. γ -Proteobacteria and Mollicutes were present in fish intestinal microbiota of all groups (Fig. 4). Actinobacteria were not detected in the intestinal microbiota of specimens fed the probiotic diet, regardless of the farming stocking density assayed. However, γ -Proteobacteria was the most frequently sequenced bacterial group in specimens from all groups assayed, ranging from 41% to 73% (Fig. 4). On the other hand, all clones related to Firmicutes phylum and sequenced from the GI tract of specimens from CHD and PHD groups were related to *Candidatus* Arthromitus (Clase Clostridia), whereas clones related to *Lactobacillus* genus (Clase Bacilli) were detected in the intestinal microbiota of fish exposed to high stocking density (Fig. 5). Important changes in γ -Proteobacteria Clase were observed in the intestinal microbiota of fish based on the farming stocking density (Fig. 5). In this context, clones related to *Pseudomonas* genus were only sequenced from the GI tract of fish from CHD and PHD groups. On the other hand, clones related to

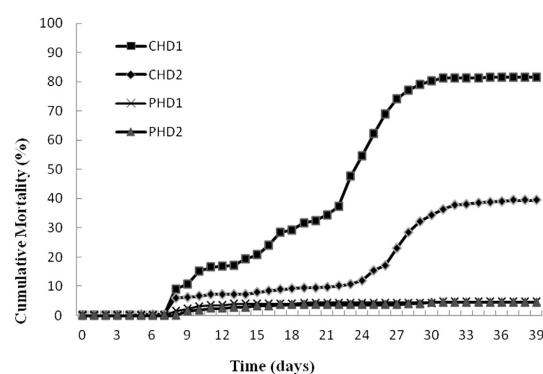


Fig. 1. Cumulative mortality (expressed as a percentage) detected in the groups of *Solea senegalensis* specimens exposed to high stocking density and fed the normal (CHD 1 and CHD2) and probiotic (PHD1 and PHD2) diets.

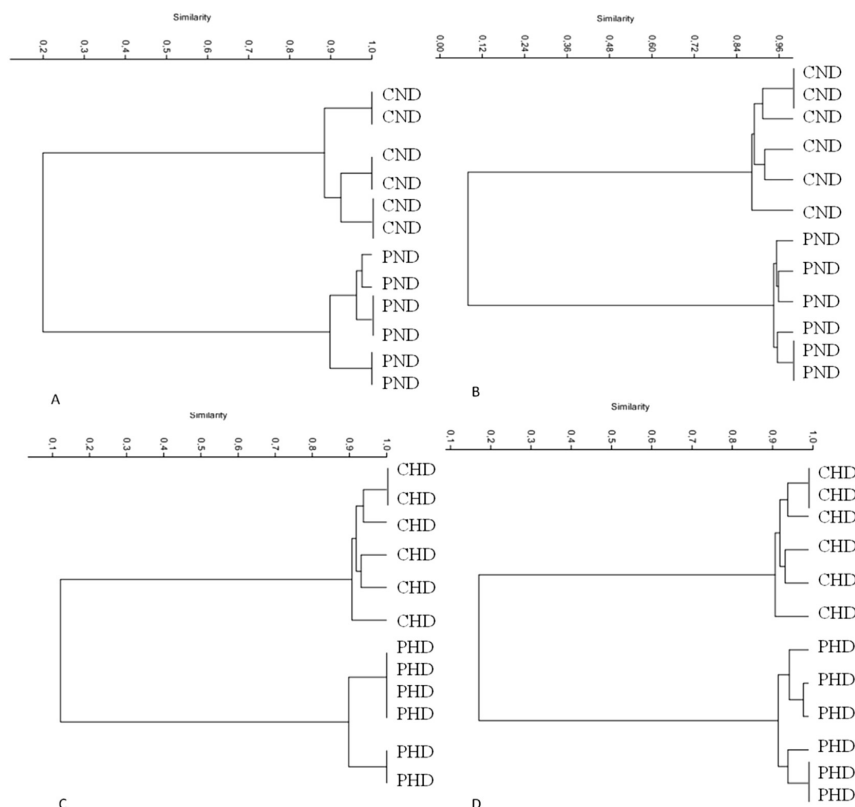


Fig. 2. Cluster analysis of DGGE patterns of the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens fed the control (C) or probiotic (P) diets and exposed to normal (CND and PHD groups) and high stocking densities (CHD and PHD groups) for 19 (A and C) and 30 days (B and D).

Photobacterium damsela subsp. *piscicida* were not sequenced when fish were exposed to high stocking density and in those specimens from PND group after 30 days receiving the probiotic diet.

Clones related to *Vibrio* genus were the most frequently sequenced microorganisms from the intestinal microbiota of the majority of fish. Those related to Harveyi clade, such as *V. parahaemolyticus*, were the most frequently sequenced from the GI tract of specimens from the CND and CHD groups, ranging from 10% to 25% (Fig. 5). However, the intestinal microbiota of CHD fish showed higher species diversity of this clade and clones related to *Vibrio campbellii* and *V. harveyi* were only detected in specimens from this group. On the contrary, *V. campbellii* and *V. harveyi* were not detected in the GI tract of fish fed the probiotic diet regardless of the stocking density assayed, whereas clones related to *Vibrio ichthyenteri* and *Vibrio scophthalmi* (3%) were only detected in the intestinal microbiota of these specimens. Due to the fact that mortality was detected in specimens from CHD and PHD groups, similarity percentage analysis (SIMPER) values to determine the contribution of each bacterial group to the observed dissimilarity between the CHD and PHD groups are summarized in Table 3. Differences at 19 days were attributed to γ -Proteobacteria (49.65%) and Firmicutes (25.52%), whereas differences at 30 days were due to γ -Proteobacteria (23%), and unidentified bacteria (22.92%).

3.3. Effect of stocking density on immune gene expression

Values of quantifications firstly made on pooled RNA from specimens of each experimental group, sampled at 19 and 30 days after the beginning of the experiment are summarized in Table 4. Given that it is not possible to perform a statistical analysis with pooled samples, we arbitrarily established changes involving variations ≥ 2.0 -fold as being different. Following this criterion, at 19 days C7, HP, HSP70, G-LYS, and NARS showed a decrease in their mRNA copy number when fish were exposed to high stocking density, regardless of treatment with or without the probiotic (CHD and PHD in comparison to CND and PND). HSP70 and G-LYS exhibited a similar behaviour at 30 days. In contrast, control fish collected at 30 days from the high density group (CHD) exhibited higher hepatic levels of C7, HAMP1, HP, NARS, NCCRP1 and TNFAI9 transcripts, in comparison with fish farmed under a normal stocking density (CND). Notably, in fish fed the probiotic diet (PHD) the amounts of these transcripts declined, recovering similar levels to those obtained in fish farmed under a normal stocking density (CND and PND).

In order to validate accurately the up- and down-regulation of the transcripts and determine the effect of inter-individual variability, absolute real-time PCR quantifications at individual level

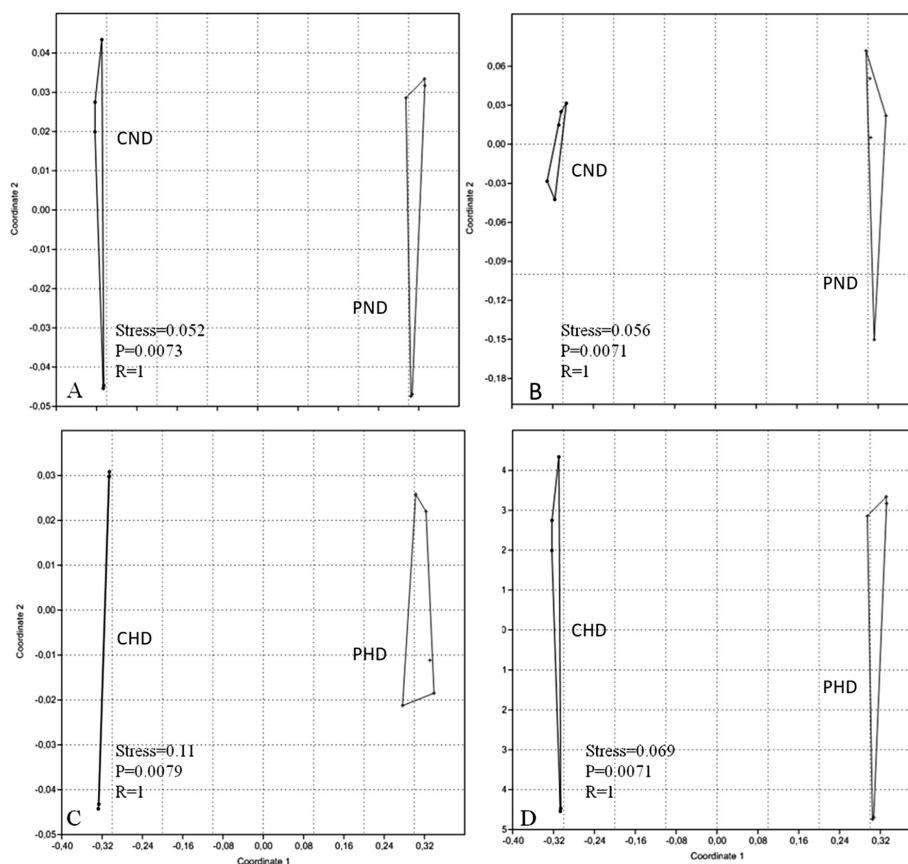


Fig. 3. Non metric multidimensional scaling (NMDS) plots using Bray–Curtis index of DGGE patterns associated with the intestinal microbiota of Senegalese sole specimens fed control (C) or probiotic (P) diets and exposed to normal (CND and PND groups) and high stocking densities (the CHD and PHD groups) for 19 (A and B) and 30 days (B and D).

was carried out. Data at individual level (Fig. 6) confirmed the results obtained in samples from mixtures of individuals.

3.4. Effect of stocking density on the histology of the intestinal tract

Histological changes in the anterior intestine of fish from the different experimental groups were assessed by light microscopy (LM) and morphometric measurements are summarized in Table 5. Statistically significant decreases in the villus height and diameter of the intestine were observed in fish from high stocking density groups (both, CHD and PHD groups) sampling being taken at 19 and 30 days. Similarly, intestine villus height was affected by high stocking density condition this decrease being more pronounced in the CHD group. The inclusion of the probiotic in fish diet and/or stocking fish at high density (PND, CHD and PHD groups) resulted in a statistically significant decrease of the diameter of the intestine, in comparison with the values found in the intestine of fish fed with the control diet and farmed under a normal stocking density (CND group).

The total number of goblet cells was similar in all groups at 19 days, but they were significantly higher in fish farmed under a high stocking density, especially in the PHD group at 30 days (Table 5).

Table 1

Species richness (R) and Shannon's index (H') values of the DGGE patterns of intestinal microbiota of Senegalese sole specimens fed control and probiotic supplemented diets and exposed to normal (CND and PND, respectively) or high stocking (CHD and PHD, respectively) densities.

		R	H'
19 days	CND	35 ± 3.27	2.38 ± 0.12
	PND	15 ± 4.28 ^a	1.46 ± 0.24 ^{a,b}
	CHD	34 ± 2.03	2.3 ± 0.23
	PHD	28 ± 1.29 ^{a,c}	2.18 ± 0.28 ^c
30 days	CND	37 ± 2.38	2.52 ± 0.85
	PND	18 ± 2.77 ^a	1.39 ± 0.20 ^{a,b}
	CHD	29 ± 1 ^{b,c}	2.38 ± 0.32
	PHD	21 ± 1 ^{a,b}	1.62 ± 0.01 ^{a,b,c}

^a Significant differences ($p < 0.05$) between probiotic diet compared to control diet.

^b Significant differences ($p < 0.05$) between 19 days compared to 30 days.

^c Significant differences ($p < 0.05$) between normal density compared to high density.

Table 2

Nearest-match identification of 16S rDNA sequences of clone libraries from intestines of Senegalese sole specimens fed control and probiotic supplemented diets and exposed to normal (CND and PND, respectively) or high stocking (CHD and PHD, respectively) densities.

Clone	Closest relative	Similarity (%)	GenBank accession	Presence after							
				19 days		30 days		19 days		30 days	
				CND	PND	CND	PND	CHD	PHD	CHD	PHD
γ-Proteobacteria											
1	<i>Acinetobacter</i> sp V(2012)	99	JN820158	—	—	—	—	—	+	—	+
2	<i>Allivibrio</i> sp T3	98	KC753328	—	—	—	—	+	—	+	—
3	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i> 0029	99	KC466554	—	+	—	—	—	+	—	—
4	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i> B04	100	HQ599852	+	+	+	—	—	+	—	—
5	<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>damsela</i> JCM8968	99	JX916292	—	+	—	—	—	+	—	+
6	<i>Pseudomonas</i> sp NJ12	98	KC880363	—	—	—	—	—	+	—	+
7	<i>Pseudomonas</i> sp RS-A-12	99	KC430953	—	—	—	—	—	+	—	+
8	<i>Pseudomonas</i> sp RS-A-14	100	KC430955	—	—	—	—	+	—	+	—
9	<i>Pseudomonas</i> sp s221	99	HM196836	—	—	—	—	—	+	—	+
10	<i>Pseudomonas putida</i> PSS5	98	KC426926	—	—	—	—	+	—	+	—
11	<i>Pseudomonas putida</i> VSHUB043	98	KC713614	—	—	—	+	—	+	—	+
12	<i>Pseudomonas putida</i> ZJB-LJ	100	JQ824856	—	—	—	—	—	+	—	+
13	Uncultured <i>Pseudomonas</i> sp 120516	99	AB773210	—	—	—	—	+	—	—	—
14	Uncultured <i>Vibrio</i> sp A3E	100	HQ897301	—	—	—	—	—	+	—	+
15	Uncultured <i>Vibrio</i> sp P-F2	99	HQ897566	+	—	+	—	—	—	—	—
16	Uncultured γ-Proteobacteria NL5BD-01-D01	98	FM852401	—	—	—	+	—	+	—	—
17	Uncultured γ-Proteobacteria KK_D06_T-20070605	99	JX435684	+	—	+	—	+	—	—	—
18	<i>Vibrio</i> sp CL1	99	JX028553	—	—	—	+	—	+	—	—
19	<i>Vibrio</i> sp HE_C5	100	FJ178094	—	+	—	+	—	+	—	+
20	<i>Vibrionaceae</i> P_C5	97	FJ178091	—	—	—	+	+	—	+	+
21	<i>Vibrio campbelli</i> VSD714	99	KC534349	—	—	—	—	+	—	+	—
22	<i>Vibrio ichthyenteri</i> FK-1	99	AM181657	—	—	—	—	—	+	—	+
23	<i>Vibrio ichthyenteri</i> SF11070701B	99	JQ904784	—	—	—	—	—	+	—	+
24	<i>Vibrio natriegens</i> C170	98	AB719184	+	+	+	+	+	+	+	+
25	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> CT11	99	JX134442	+	+	+	+	+	+	+	+
26	<i>Vibrio parahaemolyticus</i> M2-31	100	KC210810	+	—	+	—	+	—	+	—
27	<i>Vibrio scopthalmi</i> D725	99	JF836195	—	—	—	—	—	+	—	+
28	<i>Vibrio azureus</i> CD21	99	KC210817	+	—	+	—	—	—	+	—
29	<i>Vibrio harveyi</i>	99	HM584117	—	—	—	—	+	—	+	—
β-Proteobacteria											
30	Uncultured β-Proteobacteria T7_182	97	FM206221	+	—	+	+	—	—	—	+
Actinobacteria											
31	<i>Rhodococcus</i> sp TM1	99	AY642534	+	—	+	—	—	—	—	—
32	Uncultured Actinobacteria SC3-RK184	98	HF584566	—	—	—	—	+	—	+	—
Firmicutes											
33	<i>Candidatus Arthromitus</i>	97	AP122210	+	+	+	—	+	+	—	+
34	<i>Candidatus Arthromitus</i> SFB-rat Yit	100	DQ857141	—	+	—	—	—	+	—	—
35	<i>Candidatus Arthromitus</i>	99	NR_074450	+	—	+	—	+	—	—	—
36	<i>Lactobacillus fermentum</i>	99	AM117157	—	—	—	—	—	+	—	+
37	Uncultured <i>Lactobacillus</i> sp	100	AM117177	—	—	—	—	+	—	+	—
Mollicutes											
38	<i>Mycoplasma</i> sp C10	99	DQ340196	+	+	+	+	+	+	—	+
39	<i>Mycoplasma iowae</i> ATCC 33552	99	JN935877	—	+	—	—	—	—	—	—
40	<i>Mycoplasma microti</i> IL371	98	NR_025055	+	+	+	+	+	+	+	—
41	<i>Mycoplasma muris</i>	99	HQ897566	+	—	+	—	—	—	+	—
42	Uncultured <i>Mycoplasma</i> sp k.b-1	99	HM031446	—	—	—	—	—	+	—	+
Spirochetes											
43	<i>Brevinema andersonii</i> MV116	87	L31544	—	—	—	+	+	+	+	+
44	<i>Brevinema andersonii</i> ATCC 43811	98	GU993264	—	—	—	—	—	+	—	+
45	Uncultured Spirochete TP-1	100	DQ340184	—	—	—	—	+	—	+	—
46	Uncultured Spirochete 190026	99	AB194657	—	—	—	—	—	—	—	—
Unidentified microorganisms											
47	Uncultured bacterium EXO 15432	97	FM242723	+	+	+	+	+	—	—	+
48	Uncultured bacterium 2B	100	FN396941	—	—	—	—	+	+	+	+

However, the types of goblet cells were affected in a different manner. No statistically significant differences were observed among fish from the different experimental groups after 19 days treatment regarding the number of PAS + cells. However, after 30 days treatment, a statistically significant increase was observed in such cells in fish from the PHD group. Furthermore, a statistically significant increase was observed in the number of PAS + AB + cells in the intestine of fish from the PHD group, and a drastic decrease in

fish from the PND group, in comparison the group of fish fed the control diet and farmed under a normal stocking density (CND groups).

In summary, the analysis of the samples from gut tracts of the fish under high stocking densities and receiving a probiotic diet showed significant decreases in the intestine villus height and diameter and significant increases in the number of goblet cells.

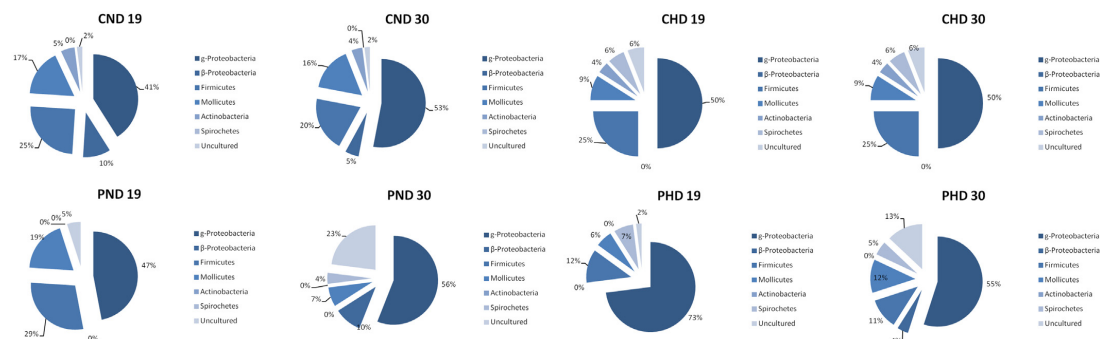


Fig. 4. Relative abundance of different microbial groups sequenced from the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens fed normal or probiotic diets exposed to normal (CND and PND, respectively) or high (CHD and PHD, respectively) densities for 19 and 30 days.

3.5. Principal Components Analysis (PCA)

The results of PCA evaluating the relationship between the status of the intestinal microbiota, gene expression, epithelial

barrier and mortality rates at 30 days are shown in Fig. 7. Two principal components account for about 70% of the total data variability. PCA showed a clear differentiation of microbial clones into two groups along the first PC axis F1 (Fig. 7A). It is possible to

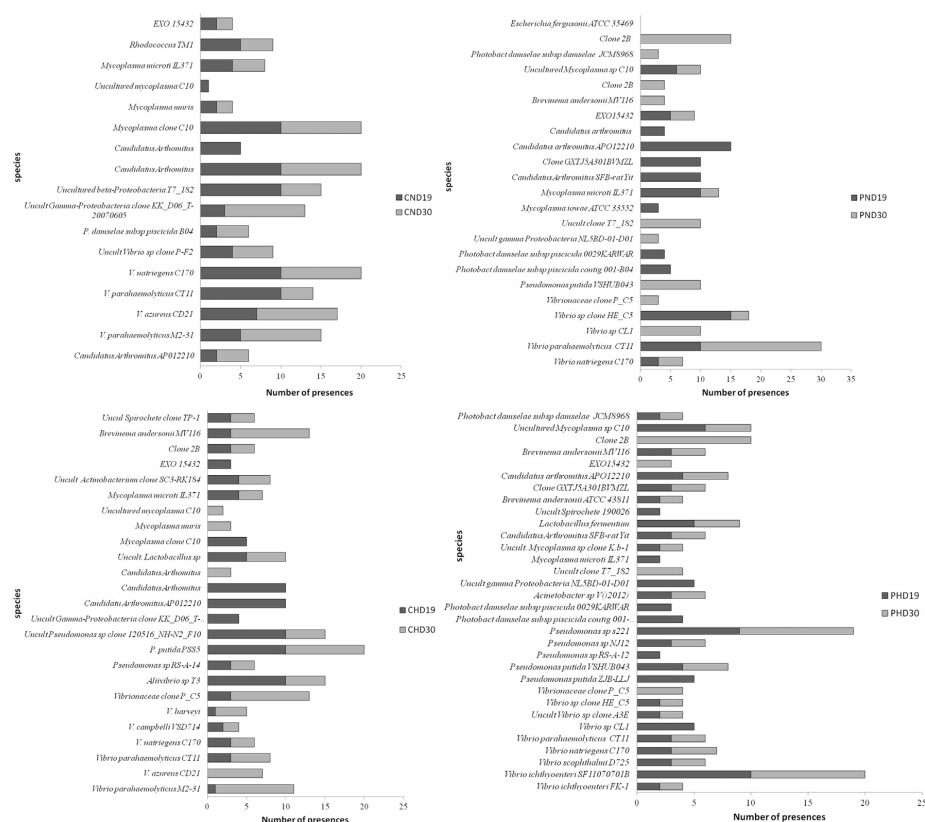


Fig. 5. Relative abundance of bacterial species sequenced from the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* specimens fed normal or probiotic diets exposed to normal (CND and PND, respectively) or high (CHD and PHD, respectively) densities for 19 and 30 days.

Table 3

SIMPER analysis performed to identify contribution of bacterial groups to total dissimilarity between control and probiotic fed *Solea senegalensis* specimens and exposed to a high stocking density for 19 and 30 days. Values correspond to dissimilarity percentages between the probiotic and control groups.

Bacterial group	Dissimilarity percentages	
	19 days	30 days
γ-Proteobacteria	49.65	23.00
β-Proteobacteria	0.00	9.00
Firmicutes	25.52	7.38
Mollicutes	8.52	10.70
Actinobacteria	8.51	9.00
Spirochetes	1.42	18.00
Unidentified bacteria	6.38	22.92

observe that the total number of goblet cells (PAS) is correlated with the presence of microbial clones only present in the intestinal microbiota of fish exposed to high stocking density and fed the probiotic diet. Fish exposed to high stocking density and fed the control and probiotic diets (CHD and PHD groups, respectively) were differentiated in two clear groups: specimens from the CHD and PHD groups scoring positive and negative on F1 axis, respectively (Fig. 7B).

High stocking density accounted for almost 30% total variance of component F2, and fish kept under high stocking were separated along F2 axis from ND fish. However, the distance in F2 axis between HD and ND stocked fish was lower for fish fed the probiotic diet, indicating attenuation of the influence of stress density.

4. Discussion

Stress increases susceptibility to infectious diseases in fish [48,49]. In this context whereas fish exposed to normal stocking densities did not show any symptoms of disease throughout the experimental trial, specimens of high density groups fed both diets (CHD and PHD) suffered an infectious outbreak with typical symptoms of vibriosis [50]. Strains of *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* were isolated and identified from the internal organs of diseased fish. These two species are included in the Harveyi clade (or *Vibrio* core group) proposed by Ref. [51], that includes *V. harveyi*, *V. campbellii*, *Vibrio rotiferianus*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Vibrio alginolyticus*, *Vibrio natriegens* and *Vibrio mytili*. Some of them include important harmful strains for aquatic organisms [52–54] and *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus* are pathogenic species for *S. senegalensis* [55].

The ability showed by *S. putrefaciens* Pdp11 to modulate the intestinal microbiota of *S. senegalensis* has been previously reported

[28,30], and this has been corroborated in this study. In this context, the administration of the probiotic diet reduced the presence of clones related to Actinobacteria and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*, and those included in the Harveyi clade. On the contrary, 30 days after the beginning of the experiments and coinciding with the mortality peak observed in the CHD group, high percentages of clones related to *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* were present in these fish intestinal microbiota. In contrast, fish from the PHD group showed lower diversity rates and a lower number of clones related to Harveyi clade than fish from CHD group, and *V. harveyi* was not detected in any fish. In addition, fish from PHD group contained clones related to *V. ichthyenteri* and *V. scophthalmi* which have been reported as a siderophore-producing bacteria and a potential probiotic candidate, respectively [56]. The ability shown by some bacteria to produce siderophores has been proposed as a potential probiotic mechanism against the pathogens [57–59]. Although the effect of probiotic diet on fish intestinal microbiota was clearly observed, bands related to *S. putrefaciens* Pdp11 were not detected from the intestines of fish fed this diet. The absence of these bands may not exclude the presence of the probiotic cells, since they could be under the detection limit of the DGGE technique which has an abundance limit of 1% [60]. In addition, the ability to colonize Senegalese sole intestine by *S. putrefaciens* Pdp11 has been reported when fish have received the same probiotic for longer periods [61,62].

The relationship between stress, immunosuppression and disease incidence has been suggested [63]. In this way, specimens included in the CHD and PHD groups showed significant immunosuppression at 19 days, given that these animals exhibited decreased levels of several transcripts coding for proteins that have been previously described as relevant in the innate immune system of *S. senegalensis* [40,41], notably as a part of the acute phase response (C7, HP, and NARS) or playing a direct role in the defence against pathogenic bacteria (G-LYZ). This result is in agreement with those reported by Ref. [7] where a marked reduction in mRNA levels of G-LYZ and HSP70 (a molecular chaperon) was observed and associated with elevated plasma levels of cortisol detected in *S. senegalensis* specimens farmed under crowding conditions. Our results are also in consonance with a decrease in the plasmatic lysozyme and alternative complement pathway described in a recent study in this fish species [64]. Overall, our data corroborate the evidence that social stressors may exert an immunological depression as has been proposed by Ref. [1]. However, at 30 days fish from the CHD group showed up-regulation of the majority of the immune related genes studied. These include the aforementioned C7, HP and NARS, as well as HAMP1, TNFAIP9, and NCCRP1. HAMP1 codes for an antimicrobial peptide that plays an important

Table 4

Absolute transcript levels in pooled samples. Quantifications were carried out in total RNA from pooled livers (≥ 5 individuals/condition). Data are transcript molecules per pg of total RNA. Numbers in boldface indicate ≥ 2 fold up-regulations while numbers in italic indicate ≥ 2 down-regulations relative to the respective controls. ^a Comparison between specimens exposed to high stocking densities vs specimens exposed to normal stocking densities; ^b Comparison between specimens farmed at 30 days vs specimens farmed at 19 days; ^c Comparison between specimens fed the probiotic diet vs specimens fed normal diet. Gene symbols are according to the NCBI Gene database.

Transcript	19 days				30 days			
	CND	PND	CHD	PHD	CND	PND	CHD	PHD
C3	8182	7124	6203	5308	4622	5128	6311	5308
C7	120	143	56 ^a	63 ^a	81	104	665^{a,b}	118 ^c
HAMP1	4.10	3.50	2.80	2.70	3.00	2.00	239^{a,b}	3.60 ^c
HP	280	202	101 ^a	85 ^a	148	155	819^{a,b}	202^{b,c}
HSP70	0.08	0.17^c	0.04 ^a	0.02 ^{a,c}	0.67^b	0.05 ^{bc}	0.17 ^{ab}	0.03 ^c
HSP90AB	224	257	382	311	172	224	248	424
g-LYZ	2.30	2.80	1.30 ^a	0.85 ^a	2.60	2.70	0.99 ^a	1.0 ^a
NARS	6.30	5.20	3.10 ^a	2.30 ^a	3.20	2.90	20^{a,b}	3.90 ^c
NCCRP1	0.17	0.12	0.10	0.08	0.11	0.16	7.40^{a,b}	0.10 ^c
TNFAIP9	24	38	47	44	23	37	863^{a,b}	41 ^c

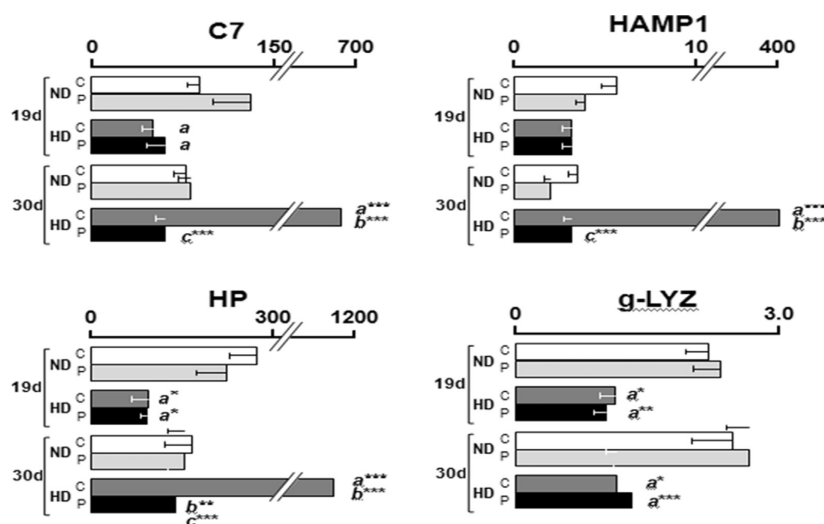


Fig. 6. Levels of transcripts of HAMP1, C7, HP y g-LYZ genes. Data are means \pm SEM of transcripts molecules/pg of total RNA from at least five fish in each group. Comparisons were made by the Student's *t*-test. Statistical significance is expressed as ****p* < 0.001, ***p* < 0.01 and **p* < 0.05. (a) Comparison of specimens exposed to high stocking density vs specimens exposed to normal densities; (b) Comparison of fish farmed for 30 days vs fish farmed for 19 days; (c) Comparison of fish treated with the probiotic vs fish untreated with the probiotic.

role in defence against invading pathogens, TNFAIP9 for a protective anti-inflammatory factor and NCCRP1 for a non-specific cytotoxic cell receptor protein involved in the antigen-binding, signaling and transcriptional regulation processes. All these genes have shown up-regulation of their transcriptional expression in specimens of *S. senegalensis* inoculated with LPS [40,41]. Hence, expression data clearly indicate that fish from the CHD group presented a microbial infection. Nevertheless, the levels of these transcripts in specimens exposed to high stocking density but fed the probiotic diet (PHD) were similar to those exhibited by fish farmed under normal densities for most genes assayed. It could indicate that the administration of *S. putrefaciens* Pdp11 assists recovery of the specimens after infection.

The higher intensity of symptoms showed by fish from CHD groups together with the fact that *V. harveyi* (HM584117) and *V. parahaemolyticus* (KC210810 and JK134442) only were isolated from skin wounds and internal organs of specimens of the CHD group may indicate that the potential route of pathogens entry

could be the wounds on the skin and from this site, dissemination could occur through the blood. *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* were described as aetiological agents of outbreaks affecting specimens of *S. senegalensis* and described as able to produce ulcers on the skin and moderate mortality [55]. However, the gastrointestinal tract is also an important portal entry of pathogens [65,66]. Thus, *V. harveyi* has been isolated from marine fish affected by gastroenteritis syndrome [67] while *V. parahaemolyticus* is considered an important intestinal pathogen [68,69]. In this context, clones related to strains isolated from skin wounds and internal organs were detected in the intestinal microbiota of fish from CHD group, and for this reason, this route could be considered as a potential portal entry of *V. harveyi* and *V. parahaemolyticus*. It is well known that stress induces alterations of the intestinal barrier, such as damage to fish enterocytes and changes in the intestinal microbiota [8,70,71], these findings being able to facilitate bacterial translocation. Bacterial translocation has been reported for indigenous and pathogenic bacteria, including some *Vibrio* species (reviewed

Table 5

Representation of the average villus height and diameter and number of goblet cells in the gut of *Solea senegalensis* specimens. Data are represented as mean \pm standard error. Different letters denote in the same column denote significant differences.

Day	Treatment	VH (μ m)	D (μ m)	Goblet cells		
				PAS+	PAS + AB+	Total
19	CND	574.4 \pm 16.4 ^a	2572.3 \pm 34.1 ^a	56.0 \pm 13.1 ^a	42.3 \pm 8.2 ^a	98.4 \pm 17.4 ^a
	PND	595.3 \pm 15.8 ^a	2384.0 \pm 54.8 ^b	70.3 \pm 26.5 ^a	44.5 \pm 17.7 ^a	114.8 \pm 34.3 ^a
	CHD	521.7 \pm 10.6 ^b	1750.8 \pm 27.8 ^c	84.9 \pm 19.9 ^a	59.5 \pm 17.2 ^a	144.4 \pm 33.8 ^a
	PHD	463.1 \pm 9.9 ^c	1680.6 \pm 30.9 ^{cd}	40.0 \pm 10.3 ^a	34.8 \pm 6.4 ^a	94.8 \pm 13.5 ^a
30	CND	639.7 \pm 11.6 ^c	2187.3 \pm 27.9 ^a	36.5 \pm 9.5 ^a	33.1 \pm 11.5 ^a	69.6 \pm 15.6 ^a
	PND	509.9 \pm 9.6 ^b	1749.6 \pm 19.5 ^b	31.0 \pm 5.6 ^a	3.5 \pm 1.4 ^b	34.5 \pm 6.1 ^a
	CHD	433.7 \pm 9.1 ^c	1775.4 \pm 26.3 ^b	44.9 \pm 18.4 ^a	39.7 \pm 17.2 ^{ab}	84.6 \pm 35.1 ^b
	PHD	480.0 \pm 9.1 ^b	1708.4 \pm 37.0 ^b	83.1 \pm 12.5 ^b	38.5 \pm 8.6 ^c	121.6 \pm 17.1 ^c

CND: control group farmed under a normal density; PND: Probiotic group farmed under a normal density; CHD: control group farmed under a high density; PHD: Probiotic group farmed under a high density. VH: villus height in the gut of *Solea senegalensis*; D: diameter of gut of *Solea senegalensis*; PAS+: Number of goblet cells stained with periodic acid technique in 1000 μ m²; PAS + AB+: Number of goblet cells stained with periodic acid and alcian blue techniques in 1000 μ m². Different letters in the same column denote significant (*p* < 0.05) differences.

by Ref. [22]). Changes in the intestinal barrier such as villus height, intestine diameter, number of goblet cells and intestinal microbiota of CHD group fish have been observed and it could facilitate translocation of *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* across the intestinal tissues. In addition to clones detected in intestines and related to *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*, other clones such as *Pseudomonas putida*, *V. campbellii* and *Candidatus Arthromitus* were also detected, and they have been described as pathogens for fish. *P. putida* is an opportunistic pathogen responsible for bacteremia in compromised hosts [72,73], but it is not a common pathogen in aquaculture [74]. Some *V. campbellii* strains have been characterized as very pathogenic for aquatic organisms such as shrimps [75], whereas others were not pathogenic [76]. On the other hand, *Candidatus Arthromitus* is a not yet culturable bacteria, and it is

responsible for rainbow trout gastroenteritis syndrome [77]. The presence of these clones in the intestine but not in internal organs seems to corroborate the possibility that the portal entry of the pathogens in this work are the ulcers on skin. However, it is suggested that opportunistic fish pathogens, such as *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi*, could remain in the mucus layer on the GI tract by adhering to mucus proteins [78] and in this way pass through the mucus layer and adhere to intestinal cells. In addition [78], have reported the ability of *V. harveyi* cells to adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream (*Pagrus major*) and [79] concluded that *V. parahaemolyticus* caused trans-epithelial resistance disruption of the M cell-like Caco-2/Raji B co-culture model system and translocated in high numbers across it. Obviously, more experiments are needed to demonstrate the potential translocation of pathogens such as *V. parahaemolyticus* and *V. harveyi* from the fish intestine to extraintestinal sites.

Higher resistance to the disease shown by PHD group fish could be due to improvement of the metabolic activity related to increased liver and plasmatic levels of metabolites such as glycogen, glucose and amino acids as reported for specimens of gilthead seabream (*Sparus aurata*) and *S. senegalensis* farmed under high stocking density and fed a diet supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 [20,80]. These findings are in agreement with those reporting that specimens of Nile tilapia farmed under crowding stress and fed a probiotic bacterial diet showed higher plasma glucose levels and RNA:DNA ratio than fish fed a conventional diet. These results suggest that probiotic supplemented diets may increase energy availability for metabolic support of stress response, and to show a good tolerance to crowding stress.

Other aspect to be considered is that PHD group specimens have higher number of goblet cells than CHD group fish and in this way they could have higher amount of mucus. In this way [81], suggested that an enhancement in the number of cells secreting mucus in specimens of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) was related to an improvement in resistance to bacterial infection. The mucus layer overlying the epithelium secreted by goblet cells acts as a medium for protection, lubrication and transport between luminal contents and epithelial cells [82]. The mucus layer provides the first line of defence against microbes and microbial products [83,84], and in this way cells of pathogenic microorganisms could have more difficulty in passing through the mucus layer and adhering to intestinal cells in fish from PHD groups. However, further experiments to demonstrate this hypothesis are necessary.

The dietary administration of probiotic cells produced an important modulation of the intestinal microbiota of fish and PCA analysis revealed the correlation between the number of total PAS cells and the presence of different clones which only were detected jointly in the intestinal microbiota of fish fed with the probiotic diet and especially in fish from the PHD group at 30 days.

Several studies have correlated the occurrence of increased numbers of goblet cells with the production capacity of eicosanoids in fish [85,86], and eicosanoids such as prostaglandins (PGs) exert control over inflammation or immunity and PGs receptors are highly expressed on the goblet cells of the intestine [87]. Data concerning the ability of some probiotics to induce changes in the mucus layer causing qualitative alterations in intestinal mucins that inhibit the adherence of enteropathogens have been reported [83,88]. The transcriptional regulation of mucins has been demonstrated to be mediated by the activation of microorganisms and their products [83,89,90]. In relation to these results, the improvement in mucus secretion in fish fed *S. putrefaciens* Pdp11 could be correlated with the intestinal microbiota present in these fish exposed to high stocking densities.

In conclusion, the results derived from this study indicate that *S. putrefaciens* Pdp11 can improve stress tolerance of *S. senegalensis*

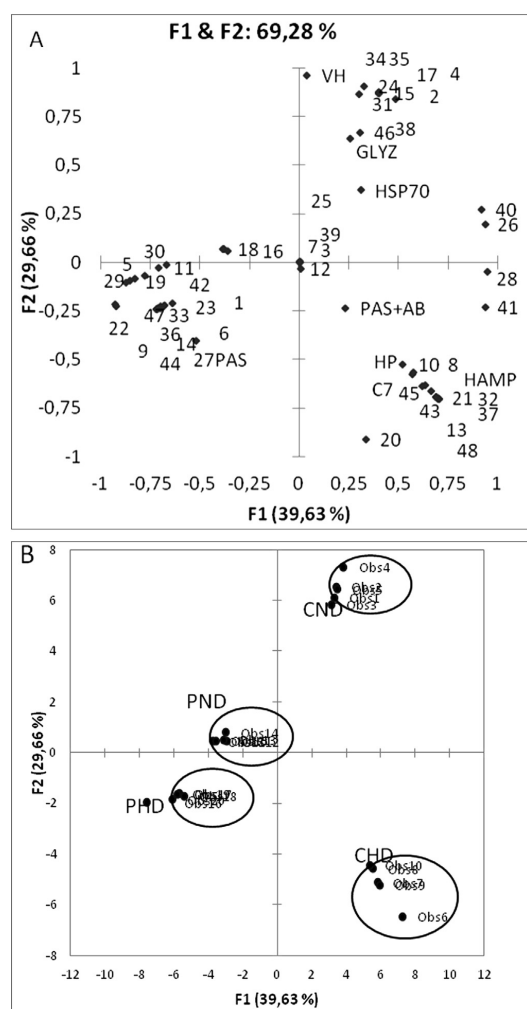


Fig. 7. Principal component analysis (PCA) applied to evaluate the relationship between the intestinal microbiota, gene expression, morphometric measurements of the cellular biology of the intestines and mortality rates of *Solea senegalensis* specimens fed normal or probiotic diets exposed to normal (CND and PND, respectively) or high (CHD and PHD, respectively) densities for 30 days.

specimens to high stocking densities by modulating the expression of important immune genes and intestine microbiota and the intestinal condition. Further studies testing the possible mechanisms for this anti-stress role of *S. putrefaciens* Pdp11 and the optimization for its administration (prior and/or during stress situations) will be necessary in order to develop its use in aquaculture.

Acknowledgements

The financial support of the Spanish Ministry of Economy and Competitiveness under Grant no. AGL-2011-30381-C03 and Fundación Séneca de la Región de Murcia (Spain) (Grant no. 04538/GERM/06, Grupo de Excelencia de la Región de Murcia) is gratefully acknowledged. H. Cordero is grateful for the FPI grant and S. T. Tapia-Paniagua wishes to thank Spanish Ministry of Economy and Competitiveness for a F.P.U. scholarship.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.fsi.2014.08.019>.

References

- [1] Tort L. Stress and immune modulation in fish. *Dev Comp Immunol* 2011;35:1366–75.
- [2] Cnaani A, Timman S, Avidar Y, Ron M, Hulata G. Comparative study of biochemical parameters in response to stress in *Oreochromis aureus*, *O. mossambicus* and two strains of *O. niloticus*. *Aquac Res* 2004;35(15):1434–40.
- [3] Verthaa AD. Disease prevalence in flounder (*Platichthys flesus*) from the Dutch Wadden Sea as indicator of environmental quality: a summary of 1988–2005 surveys. *J Sea Res* 2013;82:142–52.
- [4] Merino GE, Piedrahita RH, Conklin DE. The effect of fish stocking density on the growth of California halibut (*Paralichthys californicus*) juveniles. *Aquaculture* 2007;265:178–86.
- [5] Schram E, van der Heul JW, Kamstra A, Verdegem MCJ. Stocking density-dependent growth of Dover sole (*Solea solea*). *Aquaculture* 2006;252:339–47.
- [6] Salas-Leiton E, Anguís V, Manchado M, Cañavate JP. Growth, feeding and oxygen consumption of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles stocked at different densities. *Aquaculture* 2008;285:84–9.
- [7] Salas-Leiton E, Anguís V, Martín-António B, Crespo D, Planas JV, Infante C, et al. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Fish Shellfish Immun* 2010;28:296–302.
- [8] Bailey MT, Dowd SE, Galley JD, Hufnagle AR, Allen RG, Leyte M. Exposure to a social stressor alters the structure of the intestinal microbiota: implications for stressor-induced immunomodulation. *Brain Behav Immun* 2011;25:397–407.
- [9] Picchiatti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, et al. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immun* 2007;22:57–67.
- [10] Semova I, Carten JD, Stombaugh J, Mackey LC, Knight R, Farber SA, et al. Microbiota regulate intestinal absorption and metabolism of fatty acids in the zebrafish. *Cell Host Microbe* 2012;12:277–88.
- [11] Ringø E, Løvmo L, Kristiansen M, Bakken Y, Salinas I, Myklebust R, et al. Lactic acid bacteria vs pathogens in the gastrointestinal tract of fish: a review. *Aquac Res* 2010;41:451–67.
- [12] Ringø E, Olsen RE, Gifstad TØ, Dalmø RA, Almund H, Hemre G-I, et al. Probiotics in aquaculture: a review. *Aquac Nutr* 2010;16:117–36.
- [13] Celli J, Knodler LA. Of microbes and membranes pathogenic subversion of host cell process. *Cell Host Microbe* 2008;4:514–8.
- [14] Zhou Z, He S, Liu Y, Shi P, Yao B, Ring ØE. Do stocking densities affect the gut microbiota of gibel carp *Carassius auratus gibelio* cultured in ponds? *Aquac Res* 2011. <http://dx.doi.org/10.4172/2155-9546-S1-003>. S1:003.
- [15] Rollo A, Sulpizi R, Nardi M, Silvi S, Orpianesi C, Caggiano M, et al. Live microbial feed supplement in aquaculture for improvement of stress tolerance. *Fish Physiol Biochem* 2006;32:167–77.
- [16] Taoka Y, Maeda H, Jo J, Jeon M, Bai SC, Lee W, et al. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish Sci* 2006;72:310–21.
- [17] Gomes LC, Brinn RP, Marcon JL, Dantas LA, Brandao FR, Abreu JS, et al. The benefits of using Efinol® during transportation of cardinal tetra, *Paracheirodon axelrodi* (Schultz) in the Amazon. *Aquac Res* 2009;40:157–65.
- [18] Khafipour E, Munyaka PM, Nyachoti CM, Krause DO, Rodriguez-Lecompte JC. Effect of crowding stress and *Escherichia coli* K88+ challenge in nursery pigs supplemented with anti-*Escherichia coli* K88+ probiotics. *J Anim Sci* 2014;92:2017–29.
- [19] Tapia-Paniagua ST, Díaz-Rosales P, León-Rubio JM, García de la Banda I, Lobo C, Alarcón FJ, et al. Use of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Aquac Int* 2012;20:1025–39.
- [20] Varela JL, Ruiz-Jarabo I, Vargas-Chacoff L, Arijó S, León-Rubio JM, García-Millán I, et al. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in *Sparus aurata*. *Aquaculture* 2010;309:265–71.
- [21] Gonçalves AT, Maita M, Futami K, Endo M, Katagiri. Effects of a probiotic bacterial *Lactobacillus rhamnosus* dietary supplement on the crowding stress response of juvenile Nile tilapia *Oreochromis niloticus*. *Fish Sci* 2011;77:633–42.
- [22] Ringø E, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE. Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 2007;268:251–64.
- [23] Berg RD. Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *Adv Exp Med Biol* 1999;473:11–30.
- [24] Chabrillón M, Rico S, Balebona MC, Moriño MA. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 2005;28:229–37.
- [25] Chabrillón M, Rico RM, Arijó S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriño MA. Interactions of microorganisms isolated from gilthead seabream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* 2005;28:531–7.
- [26] Díaz-Rosales P, Arijó S, Chabrillón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua ST, Martínez Manzanera E, et al. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 2009;293:16–21.
- [27] Sáenz de Rodríguez MA, Díaz-Rosales P, Chabrillón M, Smidt H, Arijó S, León-Rubio JM, et al. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquac Nutr* 2009;15:177–85.
- [28] García de la Banda I, Lobo C, León-Rubio JM, Tapia-Paniagua S, Balebona MC, Moriño MA, et al. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 2010;306:281–8.
- [29] Salas-Leiton E, Anguís V, Martín-António B, Crespo D, Planas JV, Infante C, et al. Effects of stocking density and feed ration on growth and gene expression in the Senegalese sole (*Solea senegalensis*): potential effects on the immune response. *Aquaculture* 2010;28:296–302.
- [30] Tapia-Paniagua ST, Chabrillón M, Díaz-Rosales P, García de la Banda I, Lobo C, Balebona MC, et al. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microb Ecol* 2010;60:310–9.
- [31] Kim DH, Austin B. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immun* 2006;21:513–24.
- [32] Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Bioresour Tech* 1998;24:138–9.
- [33] Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:695–700.
- [34] Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 1994;17:915–9.
- [35] Hicks RE, Amann RI, Stahl DA. Dual staining of natural bacterioplankton with 4' 6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 1992;58:2158–63.
- [36] Kane MD, Poulsen LK, Stahl DA. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16SrRNA sequences. *Appl Environ Microbiol* 1993;59:682–6.
- [37] Gray JP, Herwig RP. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl Environ Microbiol* 1996;62:4049–59.
- [38] Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 1990;215:403–10.
- [39] Hammer Ø, Harper DAT, Ryan PD. PAST: palaeontological statistics, ver. software package for education and data analysis. *Palaeontol Electrónica* 2001;4(1):9. art. 4, 178kb, http://palaeo-electronica.org/2001_1/past/issue1_01.htm.
- [40] Prieto-Álamo MJ, Abril N, Osuna-Jiménez I, Pueyo C. *Solea senegalensis* genes responding to lipopolysaccharide and copper sulphate challenges: large-scale identification by suppression subtractive hybridization and absolute quantification of transcriptional profiles by real-time-PCR. *Aquat Toxicol* 2009;91:312–9.
- [41] Osuna-Jiménez I, Williams TD, Prieto-Álamo MJ, Abril N, Chapman JK, Pueyo C. Immune- and stress-related transcriptomic responses of *Solea senegalensis*

- stimulated with lipopolysaccharide and copper sulphate using heterologous cDNA microarrays. *Fish Shellfish Immun* 2009;26:699–706.
- [42] Pueyo C, Jurado J, Prieto-Alamo MJ, Monje-Casas F, Lopez-Barea J. Multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction for determining transcriptional regulation of thioredoxin and glutaredoxin pathways. *Methods Enzymol* 2002;347:441–51.
 - [43] Jurado J, Fuentes-Almagro CA, Prieto-Alamo MJ, Pueyo C. Alternative splicing of *c-fos* pre-mRNA: contribution of the rates of synthesis and degradation to the copy number of each transcript isoform and detection of a truncated *c-fos* immunoreactive species. *BMC Mol Biol* 2007;8:83.
 - [44] Prieto-Alamo MJ, Cabrera-Luque JM, Pueyo C. Absolute quantification of normal and ROS-induced patterns of gene expression: an in vivo real-time PCR study in mice. *Gene Expr* 2003;11:23–34.
 - [45] Mowry RW. The special value of methods that color both acidic and vicinal hydroxyl groups in the histochemical study of mucins. With revised directions for the colloidal iron stain, the use of Alcian blue G8x and their combinations with the periodic acid-Schiff reaction. *Ann N Y Acad Sci* 1963;106:402–23.
 - [46] Baeverfjord G, Kroghdal Å. Development and regression of soybean meal induced enteritis in Atlantic salmon, *Salmo salar* L., distal intestine: a comparison with the intestines of fasted fish. *J Fish Dis* 1996;19:375–87.
 - [47] Bakke-McKellep AM, Penn MH, Salas PM, Refstie S, Sperstad S, Landsverk T, et al. Effects of dietary soyabean meal, inulin and oxytetracycline on intestinal microbiota and epithelial cell stress, apoptosis and proliferation in the teleost Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Br J Nutr* 2007;97:699–713.
 - [48] Aranguren R, Tafalla C, Novoa B, Figueras A. Experimental transmission of encephalopathy and retinopathy induced by nodavirus and seabream, *Sparus aurata*, using different infection models. *J Fish Dis* 2002;25:317–24.
 - [49] Mauri I, Romero A, Acerete L, MacKenzie S, Roher N, Callol A, et al. Changes in complement responses in gilthead seabream (*Sparus aurata*) and European seabass (*Dicentrarchus labrax*) under crowding stress, plus viral and bacterial challenges. *Fish Shellfish Immun* 2011;30:182–8.
 - [50] Austin B. Vibriosis as causal agents of zoonoses. *Vet Microbiol* 2010;140:310–7.
 - [51] Sawabe T, Kita-Tsukamoto K, Thompson FL. Inferring the evolutionary history of vibrios by means of multilocus sequence analysis. *J Bacteriol* 2007;189:7932–6.
 - [52] Thompson FL, Lida T, Swings J. Biodiversity of vibrios. *Microbiol Mol Biol Rev* 2004;68:403–31.
 - [53] Austin B, Zhang XH. *Vibrio harveyi*: a significant pathogen of marine vertebrates and invertebrates. *Lett Appl Microbiol* 2006;43:119–24.
 - [54] Defoirdt T, Halet D, Vervaeren H, Boon N, Van de Wiele T, Sorgeloos P, et al. The bacterial storage compound poly-beta-hydroxybutyrate protects *Artemia franciscana* from pathogenic *Vibrio campbellii*. *Environ Microbiol* 2007;9:445–52.
 - [55] Zorrilla I, Arijó S, Chabrillon M, Díaz P, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, et al. *Vibrio* species isolated from diseased farmed sole, *Solea senegalensis* (Kaup), and evaluation of the potential virulence role of their extracellular products. *J Fish Dis* 2003;26:103–8.
 - [56] Sugita H, Mizuki H, Itoi S. Diversity of siderophore-producing bacteria isolated from the intestinal tracts of fish along the Japanese coast. *Aquac Res* 2010;43:481–8.
 - [57] Holmstrom K, Gram L. Elucidation of the *Vibrio anguillarum* genetic response to the potential fish probiont *Pseudomonas fluorescens* AH2 using RNA-arbitrarily primed PCR. *J Bacteriol* 2003;185:831–42.
 - [58] Patel AK, Ahire JJ, Pawar SP, Chaudhari BL, Shouche YS, Chincholkar SB. Evaluation of probiotic characteristics of Siderophoregenic *Bacillus* spp. Isolated from dairy waste. *Appl Biochem Biotechnol* 2010;160:140–55.
 - [59] Strom-Bestor M, Wiklund T. Inhibitory activity of *Pseudomonas* sp on *Flavobacterium psychrophilum*, in vitro. *J Fish Dis* 2011;34:255–64.
 - [60] Fromin N, Hamelin J, Tarnawski S, Roesti D, Jourdain-Miserez K, Forestier N, et al. Statistical analysis of denaturing gel electrophoresis (DGGE) fingerprinting patterns. *Environ Microbiol* 2002;4:634–43.
 - [61] Lobo C, Moreno-Ventas X, Tapia-Paniagua S, Rodríguez C, Morínigo MA, García de la Banda I. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiol Biochem* 2014;40:295–309.
 - [62] Tapia-Paniagua ST, Díaz-Rosales P, García de la Banda I, Lobo C, Clavijo E, Balebona MC, et al. Modulation of certain liver fatty acids in *Solea senegalensis* is influenced by the dietary administration of probiotic microorganisms. *Aquaculture* 2014;424–425:234–8.
 - [63] Wenderlaar Bonga SE. The stress response in fish. *Physiol Rev* 1997;77:591–625.
 - [64] Costas B, Aragao C, Dias J, Afonso A, Conceição LEC. Interactive effects of a high-quality protein diet and high stocking density on the stress response and some innate immune parameters of Senegalese sole *Solea senegalensis*. *Fish Physiol Biochem* 2013;9:1141–51.
 - [65] Michel C, Bernardet JF, Daniel P, Chilmonecysk S, Urdaci M, de Kinkelin P. Clinical and aetiological aspects of a summer enteric syndrome associated with the sporulating segmented filamentous bacterium *Candidatus arthromitus* in farmed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *J Fish Dis* 2002;25:533–43.
 - [66] Ringø E, Jutfelt F, Kanapathipillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, et al. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L. Cell Tissue Res 2004;318:305–11.
 - [67] Liu PC, Lin JY, Chuang WH, Lee KK. Isolation and characterization of pathogenic *Vibrio harveyi* (*V. carchariae*) from the farmed marine cobia fish *Rachycentron canadum* L. with gastrointestinal syndrome. *World J Microbiol Biotechnol* 2004;20:495–9.
 - [68] Ritchie JM, Rui HP, Zhou XH, Iida T, Kodoma T, Ito S, et al. Inflammation and disintegration of intestinal villi in an experimental model for *Vibrio parahaemolyticus*-induced diarrhea. *Plos Pathog* 2012;8:e1002593. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1002593>.
 - [69] Luis-Villasenor IE, Castellanos-Cervantes T, Gomez-Gil B, Carrillo-García A, Campa-Cordova AI, Ascencio F. Probiotics in the intestinal tract of juvenile whiteleg shrimp *Litopenaeus vannamei*: modulation of the bacterial community. *World J Microbiol Biotechnol* 2013;29:257–65.
 - [70] Olsen RE, Sundell K, Hansen T, Hemre G-I, Myklebust R, Mayhew TM, et al. Acute stress damages intestinal lining of Atlantic salmon, *Salmo salar* L. An electron microscopical study. *Fish Physiol Biochem* 2003;26:211–21.
 - [71] Olsen RE, Sundell K, Mayhew TM, Myklebust R, Ringø E. Acute stress alters intestinal function of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* (Walbaum). *Aquaculture* 2005;250:480–95.
 - [72] Perz JF, Craig AS, Stratton CW, Bodner SJ, Phillips WE, Schaffner W. *Pseudomonas putida* septicemia in a special care nursery due to contaminated flush solutions prepared in a hospital pharmacy. *J Clin Microbiol* 2005;43:5316–8.
 - [73] Iwalokun BA, Akinsinde KA, Lanlhin O, Onubogu CC. Bacteriocinogenicity and production of pyocins from *Pseudomonas* species isolated in Lagos, Nigeria. *Afr J Biotechnol* 2006;5:1072–7.
 - [74] Atinok I, Kayis S, Capkin E. *Pseudomonas putida* infection in rainbow trout. *Aquaculture* 2006;261:850–5.
 - [75] Haldar S, Chatterjee S, Sugimoto N, Das S, Chowdhury N, Hinenoya A, et al. Identification of *Vibrio campbellii* isolated from diseased farm-shrimps from south India and establishment of its pathogenic potential in an Artemia model. *Microbiology* 2011;157:179–88.
 - [76] Ruwandeepika HAD, Defoirdt T, Bhowmick PP, Shekar M, Bossier P, Karunasagar I. Presence of typical and atypical virulence genes in vibrio isolates belonging to the *Harveyi* clade. *J Appl Microbiol* 2010;109:888–99.
 - [77] Cecchini F, Iacumin L, Fontanot M, Comi G, Manzano M. Identification of the unculturable bacteria *Candidatus arthromitus* in the intestinal content of trout using Dot blot and Southern blot techniques. *Vet Microbiol* 2012;156:389–94.
 - [78] Chisada S, Shimizu K, Kamada H, Matsunaga N, Okino N, Ito M. Vibrios adhere to epithelial cells in the intestinal tract of red sea bream, *Pagrus major*, utilizing GM4 as an attachment site. *FEMS Microbiol Lett* 2013;341:18–26.
 - [79] Finn R, Ahmad T, Coffey ET, Brayden DJ, Baird AW, Boyd A. Translocation of *Vibrio parahaemolyticus* across an in vitro M cell model. *FEMS Microbiol Lett* 2014;350:65–71.
 - [80] García de la Banda I, Lobo C, Lucas LM, Moreno-Ventas X, Mira JR, Medina-López A, et al. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes welfare and confers resistance against pathogens on *Solea senegalensis* juveniles cultured at low and high densities. In: Abstracts of the V International sole Workshop, Faro (Portugal); 2011. p. 24.
 - [81] Torrecillas S, Makol A, Benítez-Santana T, Caballero MJ, Montero D, Sweetman J, et al. Reduced gut bacterial translocation in European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides (MOS). *Fish Shellfish Immun* 2011;30:674–81.
 - [82] Smirnov A, Perez R, Amit-Romach E, Sklan D, Uni Z. Mucin dynamics and microbial populations in chicken small intestine are changed by dietary probiotics and antibiotic growth promoter supplementation. *J Nutr* 2005;135:187–92.
 - [83] Kim YS, Ho SB. Industrial goblet cells and mucins in health and disease: recent insights and progress. *Curr Gastroenterol Rep* 2010;12:319–30.
 - [84] Barceló A, Claustre J, Moro F, Chayvialle JA, Cuber JC, Plaisancié. Mucin secretion is modulated by luminal factors in the isolated vascularly perfused rat colon. *Gut* 2000;46:218–24.
 - [85] Holland JW, Taylor GW, Rowley AF. The eicosanoid generating capacity of isolated cell populations from the gills of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Comp Biochem Physiol Part C* 1999;122:297–306.
 - [86] Torrecillas S, Makol A, Betancor MB, Montero D, Caballero MJ, Sweetman J, et al. Enhanced intestinal epithelial barrier health status on European sea bass (*Dicentrarchus labrax*) fed mannan oligosaccharides. *Fish Shellfish Immunol* 2013;34:1485–95.
 - [87] Northey A, Denis D, Cirino M, Metters KM, Nantel F. Cellular distribution of prostanoic EP receptors mRNA in the rat gastrointestinal tract. *Prostagl Other Lipid Mediat* 2000;62:145–56.
 - [88] Sherman PM, Ossa JC, Johnson-Henry K. Unraveling mechanisms of action of probiotics. *Nutr Clin Pract* 2009;24:10–4.
 - [89] Andrianifahanana M, Moniaux N, Baha SK. Regulation of mucin expressions mechanistic aspects and implications for cancer and inflammatory diseases. *Biochim Biophys Acta* 2006;1765:189–222.
 - [90] Thai P, Loukoianov A, Wachi S, Wu R. Regulation of airway mucin gene expression. *Annu Rev Physiol* 2008;102:1103–16.



Contents lists available at ScienceDirect

Aquaculture

journal homepage: www.elsevier.com/locate/aqua-onlineBenefits of probiotic administration on growth and performance along metamorphosis and weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*)Carmen Lobo ^{a,*}, Silvana Tapia-Paniagua ^{b,1}, Xabier Moreno-Ventas ^c, F. Javier Alarcón ^d, Covadonga Rodríguez ^e, M^a. Carmen Balebona ^b, Miguel A. Moriño ^b, Inés García de La Banda ^a^a Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Santander, 39080 Santander, Spain^b Ecological Area of Water and Environmental Sciences and Technics, University of Cantabria, 39005 Santander, Spain^c Department of Microbiology, Faculty of Sciences, University of Málaga, 29071 Málaga, Spain^d Department of Biology and Geology, University of Almería-CEA3, La Cañada de San Urbano, Almería 04120, Spain^e Department of Animal Biology, Faculty of Biology, University of La Laguna, 38206 La Laguna, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 February 2014

Received in revised form 16 April 2014

Accepted 11 June 2014

Available online 21 June 2014

Keywords:

Solea senegalensis larviculture

growth performance

gut microbiota

Probiotics

Shewanella

Digestive enzymes

ABSTRACT

Suitable nutrition at first feeding in marine fish larvae is an important factor for successful larval and juvenile rearing. In this way probiotic supplementation may contribute to better face the habitual stress of metamorphosis and weaning at early sole stages. The aim of this study was to optimize *Shewanella putrefaciens* Pdp11 administration to Senegalese sole (*Solea senegalensis*) at early stages of development. For this purpose, we studied the influence of a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 (10–30 dah) on growth performance, gut microbiota modulation, digestive enzymes activities and body composition. These probiotic bacteria were incorporated using *Artemia* as live vector (2.5×10^7 cfu mL⁻¹) and supplied to sole specimens in a co-feeding regime (Gemma, Skretting) by triplicate. *S. putrefaciens* Pdp11 colonized larval gut being present from 23 to 119 dah. Probiotic supply significantly modulated larval and fry gut microbiota. A PCA analysis including all the parameters analyzed strongly associated *S. putrefaciens* Pdp11 presence with a higher fish growth, a higher digestive proteolytic activity level and a fish body composition modulation along *S. senegalensis* rearing. In addition less size variability was obtained from metamorphosis until the end of weaning. In conclusion a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 (10–30 dah) seems sufficient to obtain a suitable microbial modulation involved in a better growth performance and body composition that suggests a great potential for sole aquaculture production.

© 2014 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Senegalese sole (*Solea senegalensis*) is a promising flatfish species for intensive marine farming (Conceição et al., 2007) due especially to its high market value (Borges et al., 2009). Despite recent significant advances in weaning techniques and larvae feeding (Engrola et al., 2007; Imsland et al., 2003), the production of high quality sole juveniles is still a bottleneck (Damaso-Rodríguez et al., 2010). The main factors affecting *S. senegalensis* production performance are disease control, advanced weaning, nutrient requirements and optimization of feeding protocols (Conceição et al., 2007; Engrola et al., 2007). In addition, the high amplitude of size dispersion coefficients in *S. senegalensis*

cultivated stocks is still an important issue in the sole farming industry (Salas-Leiton et al., 2010; Sánchez et al., 2010).

Appropriate nutrition at first feeding in marine fish larvae including *Solea solea* and *S. senegalensis* is an important factor for successful larval and juvenile rearing (Damaso-Rodríguez et al., 2010; Heath and Moore, 1997). Marine fish larvae have generally a poorer capacity to digest and/or absorb complex nutrients in comparison with larger fish (Ronnestad and Conceicao, 2005), and much higher growth rates (Conceicao et al., 1998). This very high growth potential of fish larvae means greater requirements in terms of energy, amino acids (AAs), highly unsaturated fatty acids (HUFAs), phospholipids (PLs) and other nutrients. However the exact requirements for fish larvae are poorly characterized, even for the better studied species (Conceicao et al., 2007; Rodríguez et al., 2009). The protein and lipid requirements of fish have been reported to vary according to many different factors such as the species size or age, dietary protein quality and level of energy, water quality, presence of natural food and feeding and culture management (NCR, 1993; Rodríguez et al., 2009), even though it is well known that lipid/protein ratio influences fish growth and nutrient efficiency (Aliyu-Paiko et al., 2010; Li et al., 2012; Ronnestad and Conceicao,

* Corresponding author at: Spanish Institute of Oceanography, Oceanographic Center of Santander, Promontorio San Martín s/n, Apdo. 240, 39080 Santander, Spain. Tel.: +34 942 321513; fax: +34 942 323486.

E-mail address: carmen.lobo@st.ieo.es (C. Lobo).

¹ These authors contributed equally to this work.

2005; Sargent et al., 2002). In this way a suitable balance of lipids can help the fish achieve the so called protein sparing effect, by means of a shift of dietary protein from energetic purposes into growth (Li et al., 2012; Ronnestad and Conceicao, 2005). Taking into account these last considerations, digestion is a particularly relevant process in animal nutrition since it influences the bioavailability of nutrients needed for fish growth. The analysis of digestive enzymes is a key tool when studying the nutritional condition and adaptation of fish to dietary changes. In particular, the evolution of digestive activities during larval maturation of *S. senegalensis* has twofold interest. On the one hand, the assessment of the presence and level of certain enzymatic activities may be used as a comparative indicator of the fish development rate, as well as of their further survival rate (Cara et al., 2007). On the other hand, changes in enzymatic activities can be used for studying the effects of the dietary additives that might modulate the maturation process of the digestive system (Gisbert et al., 2009). In this way dietary probiotic addition is being increasingly reported as an enzymatic contributor to digestion (Sun et al., 2013; Tinh et al., 2008).

Fish larvae are exposed to microbiota-associated disorders because they start feeding when the digestive tract is not fully developed (Ronnestad and Conceicao, 2005; Stotttrup and McEvoy, 2003) and the immune system is still incomplete (Vadstein, 1997). For this reason probiotic treatments are particularly desirable at these stages (Tinh et al., 2008) providing a balanced gut microbiota condition (Olafsen, 2001).

The gastrointestinal tract serves as a route for entry of pathogenic microorganisms (Chen et al., 2008; Ringo et al., 2004) and it is believed to be the major route for the onset of diseases like vibriosis, furunculosis, enteric septicaemia and aeromoniasis in fish (Nayak, 2010). A healthy intestinal microbiota not only aids the digestive function but also acts by inhibiting pathogens (Makridis et al., 2005; Sugita et al., 2002). In a healthy specimen a proper balance between the intestinal microbiota and the host's control mechanism (Nayak, 2010; Sansonetti, 2004) occurs and if this balance is disturbed, the pathogens can establish infections (Sekirov and Finlay, 2009; Virgin, 2007).

In addition probiotic application has increased in fish aquaculture based on the beneficial effects obtained previously in livestock (Fulton et al., 2002) and humans (Gills, 2003). Due to the different environmental conditions of aquatic animals, probiotics have frequently been selected from specimens and environmental autochthonous bacteria (Chabrilón et al., 2005a,b; Lauzon et al., 2010). In this way *Shewanella putrefaciens* Pdp11, isolated from the skin mucus of healthy cultured gilthead seabream *Sparus aurata*, was *in vitro* selected by its antagonism against the main pathogens of *S. senegalensis* (Chabrilón et al., 2005a). This probiotic strain has increased *in vivo* pathogen resistance of *S. senegalensis* (Díaz-Rosales et al., 2009; García de la Banda et al., 2010, 2011; Tapia-Paniagua et al., 2012), and *S. aurata* on-growing (Salinas et al., 2006; Varela et al., 2010). Furthermore *S. putrefaciens* Pdp11 enhanced growth, improved biochemical composition, activated digestive enzyme activity and improved intestinal epithelium integrity in sole juveniles (García de la Banda et al., 2010, 2012; Sáenz de Rodríguez et al., 2009). Moreover it has been reported that *S. putrefaciens* Pdp11 colonized sole gut modulating intestinal microbiota (Lobo et al., 2014; Tapia-Paniagua et al., 2012).

In a previous larval trial it was demonstrated that continuous administration of *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulated in *Artemia* until the end of weaning period modulated gut microbiota increasing growth performance and feed utilization efficiency in *S. senegalensis* fry (Lobo et al., 2014). In addition (García de la Banda et al., 2011) evidence of a rapid immune stimulation in sole juveniles was apparent by *S. putrefaciens* Pdp11 supply in feed. Considering the above mentioned, the aim of the present study was to assess the effect of a short pulse of probiotic during metamorphosis (from 10 to 30 dah) on growth performance, gut microbiota modulation, digestive enzymes and body composition in *S. senegalensis* at early development.

2. Material and methods

2.1. Microorganisms

S. putrefaciens Pdp11 was grown in 5 mL of tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 1.5% NaCl (TSBs) for 18 h at 22 °C, with continuous shaking. Aliquots of 0.1 mL of the culture were spread onto plates of tryptone soy agar, (Difco™, Sparks, USA), supplemented with 1.5% NaCl (TSAs) and incubated daily at 22 °C. Bacterial suspensions were prepared by scraping the cells from the plates and suspending them in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7). The number of bacterial cells mL⁻¹ was measured at 600 nm by using a Hach DR/2500 Laboratory Spectrophotometer (Loveland, Colorado, USA). Probiotic cells were supplied (2.5×10^7 cfu mL⁻¹) at the final period of enrichment of *Artemia* (200–300 metanauplii mL⁻¹). This dose has been previously reported as suitable by Lobo et al. (2014) and is in the range of other probiotics used in larviculture (Dias et al., 2011; Hernández-Martínez et al., 2009). No probiotic cells were supplied to an *Artemia* incubator used as control. After an incubation period of 3–9 h the concentration of total bacteria was 10^4 cfu *Artemia* metanauplii⁻¹ where *S. putrefaciens* Pdp11 cells accounted at least for 50%. These values are similar to those reported by other authors (Carnevali et al., 2004; Villamil et al., 2003). No mortalities of *S. putrefaciens* Pdp11 or of *Artemia* metanauplii were registered during the incubation period. *Artemia* from both incubators (45 L) were maintained at 23 °C and rinsed with 1 µm filtered seawater for 5 min prior to their supply to rearing tanks.

S. putrefaciens Pdp11 was characterized by using ID-GNB Vitek 2 (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) including 64 tests. Probiotic strain was cultivated on TSAs at 22 °C for 2 days and pure colonies suspended in sterile PBS (pH 7.2). The strip was inoculated and incubated at 22 °C for 4 h. A rapid identification of constitutive enzymes based on color development due to enzyme activity was then performed.

2.2. Larval rearing conditions

Embryos were incubated at 19.0 ± 0.5 °C in 70 L cylinder-conical incubating tanks with gentle aeration and a continuous water flow of ten times per day. Newly hatched larvae (40 individuals L⁻¹) were randomly distributed into 250 L circular polyester tanks by triplicate, with constant aeration and seawater renewal. Temperature varied between 17.8 ± 0.8 °C (1–56 dah), 18.9 ± 0.4 °C (57–85 dah) and 19.6 ± 1.1 °C (86–119 dah). Salinity was 35.4 g L⁻¹ throughout the trial. Illumination (1000 lx on surface water) was provided with Sylvania mini-lynx fast start lamps. It was continuous until 10 dah and a 12:12L:D cycle was established until 21 dah. Afterwards postlarvae were reared in semidarkness (<20 lx on surface). Continuous water inflow was maintained to provide suitable oxygen and nitrite seawater levels for larval and postlarval culture (Lund et al., 2007; Parra and Yúfera, 1999). Once the larvae metamorphosed and became benthic, the experimental tanks were emptied, and survival checked. Fish were then randomly redistributed relative to both dietary treatments assayed and stocked at a density of 3000 individuals m⁻² (each dietary treatment 3 replicates). In addition, due to the high stocking density, on 41 dah postlarvae from each replicate were taken out to adjust the density to 2500 individuals m⁻². Finally, after the weaning period (on 87 dah), the tanks were emptied and fish were randomly redistributed and stocked by triplicate at a density of 1250 individuals m⁻² until the end of the feeding trial.

The feeding regime was based on Cañavate and Fernández-Díaz (1999). From 3 to 9 dah *Isochrysis galbana* enriched rotifers were added to the tanks twice a day to maintain a rotifer density of 20 individuals mL⁻¹. Microalgae (*Nannochloropsis gaditana*, 3×10^5 cells mL⁻¹ and *I. galbana*, 7×10^4 cells mL⁻¹) were also supplied during this period to ensure a good rotifer quality. From 10 to 57 dah co-feeding was carried out with *Artemia* and the commercial pellet Gemma Micro Diamond (crude protein 57% and total lipids 15%,

Skretting, Burgos, Spain). *Artemia* nauplii (AF strain INVE Aquaculture, Ghent, Belgium), was supplied from 10 to 12 dah and *Artemia* metanauplii (EG strain INVE Aquaculture, Ghent, Belgium) thereafter. Both *Artemia* stages were previously enriched with Origreen (fresh protein 43% and total lipids 30% Skretting, Burgos, Spain) for 18 h, and then supplied to the tanks four times a day, whereas dry feed was supplied eight times a day. Weaning started at 58 dah (Gemma Wean Diamond, crude protein 60% and total lipids 15%, Skretting, Burgos, Spain). Larvae were fed exclusively with dry feed (Gemma Diamond), after 87 dah. The amount of inert feed was gradually increased from 58 dah (39 g m^{-2} , 69.2% of total feed) to 87 dah (117 g m^{-2}), while *Artemia* doses were progressively reduced from 14 metanauplii mL^{-1} . At the end of the trial, fry were fed 11.3% of total tank biomass. Two live feeding regimes were compared: Pdp11 and Control groups. Pdp11 group consisted of *S. putrefaciens* Pdp11 bacterial strain bioencapsulated in Origreen enriched *Artemia*. The treatment was given three times a day (from 10 to 30 dah), whereas no bacteria were administered to the Control group. After 30 dah and until the end of weaning all larvae were fed with *Artemia* control. Each dietary treatment was evaluated by triplicate.

2.3. Growth and survival

For growth studies, thirty specimens from each replicate were weekly and randomly sampled. Fish total length was measured by a profile projector (V-12B Nikon, Japan) until 60 dah, and by an ichthyometer until the end of the trial. After length measurement, specimens were rinsed with distilled water, put onto pre-weighed glass fiber filters, and dried at 60°C for 48 h, in order to obtain larval and fry dry weight. Survival was checked along the experiment.

2.4. Analysis of body composition

Samples from Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 bioencapsulated *Artemia* metanauplii were collected in three eppendorf tubes, immediately frozen and stored at -80°C for the determination of total soluble protein and lipid contents. For the study of larval and fry body composition five samples were randomly collected from each rearing tank on days 23 (75), 56 (15), 87 (6) and 119 (6), the numbers in parenthesis being the total number of specimens sampled per replicate. Fish samples were washed several times with distilled water prior to being frozen at -80°C , until analysis. Total soluble protein was determined following the method of Bradford (1976). Total lipid content was assessed by extraction with chloroform-methanol 2:1 as described by Bligh and Dyer (1959) modified by Fernández-Reiriz et al. (1989) and gravimetrically determined after centrifugation.

2.5. Analysis of gut microbiota

Six larvae from each batch were sampled on days 23, 56, 87 and 119 dah and analyzed for digestive microbiota. The whole intestines were aseptically removed and stored at -20°C until further analysis. The intestinal contents were homogenized in 1 mL PBS (pH 7.2), and 1 mL aliquot was centrifuged at $1000 \times g$ for 5 min. Total DNA was extracted from samples as described by Martínez et al. (1998), with some modifications as described by Tapia-Paniagua et al. (2010). Agarose gel (1.5% [w/v]) electrophoresis in the presence of ethidium bromide was used to visually check for DNA quality and yield. To determine the presence of the probiotic *S. putrefaciens* Pdp11 in the intestinal microbiota of larvae, an axenic culture of the probiotic strain was grown up to the exponential phase in TSBs and then centrifuged at $2500 \times g$ for 15 min. Pellets were washed with PBS and the resulting pellet was used for DNA extraction following the instructions of the Fast DNA Spin kit (Qbiogene, CA, USA).

In order to compare Denaturing Gradient Gel Electrophoresis (DGGE) patterns of the intestinal microbiota of soles receiving the different experimental treatments, the DNA was amplified using the 16S

rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F(5'-CGCCCGGGCGCCGCCCGGGGACCGGGGAACGCGAAGAACCTTAC-3') and 1401-R (5'-CGGT-GTGTAACAGACCC-3') (Kim and Austin, 2006; Kostantinov et al., 2003). These primers were used to amplify V6–V8 regions of 16S rDNA (55) and yields amplicons of 470-bp length. PCR mixtures and conditions to perform PCR were those previously described by Tapia-Paniagua et al. (2010).

The amplicons obtained from the intestinal lumen-extracted DNA and the probiotic strain were separated by DGGE, according to the specifications of Muyzer et al. (1993) using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Alcobendas, Spain). Electrophoresis was performed in an 8% polyacrylamide gel (37.5:1 acrylamide-bisacrylamide; dimensions, 200 by 200 by 1 mm) using a 30 to 55% denaturing gradient for separation of PCR products. The gels contained a 30 to 55% gradient of urea and formamide increasing in the direction of the electrophoresis. A 100% denaturing solution contained 7 M urea and 40% (v/v) deionized formamide. PCR samples were applied to gels in aliquots of 13 μL per lane. The gels were electrophoresed for 16 h at 85 V in $0.5 \times \text{TAE}$ (20 mM Tris acetate [pH 7.4], 10 mM sodium acetate, 0.5 mM $\text{Na}_2\text{-EDTA}$) buffer at a constant temperature of 60°C (Sambrook and Fritsch, 1989) and subsequently stained with AgNO_3 (Sanguinetti et al., 1994). A DGGE analysis for all samples was performed twice.

DNA extracted from larvae fed the same diet and for a specific sampled time were mixed to carry out the cloning process. PCR was performed with a Taq DNA polymerase kit from Life Technologies. The forward primer S-D-Bact-0008-aS-20 (5'-AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') (Hicks et al., 1992), which targets the domain Bacteria, and the reverse primer S*-Univ-1492-b-A-21 (59ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') (Kane et al., 1993) which amplifies the bacterial 16S rDNA. Amplification was carried out as described by Gray and Herwig (1996). Reaction tubes contained 100 ng of total DNA, 1.25 U of Taq DNA polymerase (from Life Technologies), buffer, 2.5 mM MgCl_2 , 200 μM dNTP's each deoxyribonucleotide triphosphate, and 10 μM each primer in a final volume of 50 μL . Initial DNA denaturation and enzyme activation steps were performed at 94°C for 10 min in a Eppendorf thermocycler, followed by 30 cycles of denaturation at 92°C for 1 min, annealing at 48°C for 1 min, and elongation at 72°C for 1 min 30 s, which was followed by a final elongation at 72°C for 5 min. PCR products were purified and concentrated with a High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche) according to the manufacturer's instructions. Purified PCR product was cloned into a pGEM-T (Promega, Madison, WI, USA). Ligation was performed at 4°C overnight followed by transformation into competent *Escherichia coli* JM109. One hundred colonies of ampicillin-resistant transforms from each diet and day sampled (800 colonies) were transferred with a sterile toothpick to 100 μL TE buffer and boiled for 10 min at 95°C . PCR was then immediately performed with pGEMT-specific primers T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3') and SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'). Plasmids containing an insert were used to amplify the V6–V8 region of 16S rDNA. The amplicons were used for sequence analysis (Macrogen Korea sequencing). The resulting sequences (~500 bp) were compared with the sequences from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) or Greengenes DNA sequence database using the BLAST sequence algorithm (Altschul et al., 1990).

2.6. Intestinal enzyme analysis

For the study of intestinal enzyme activities, five samples of feed larvae were randomly collected from rearing tanks, in triplicate (the numbers in parenthesis are the number of specimens sampled per replicate) at days 23 (75), 30 (30), 56 (3), 87 (3) and 119 (3). After being sampled, fish were rinsed with distilled water to remove external marine water, and then frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C . For the preparation of enzymatic extracts, sampled larvae were individually dissected to remove head and tail under a binocular microscope on a pre-chilled glass plate maintained at 4°C . The visceral bulks were homogenized as pool (200 mg mL^{-1}) in cold distilled water. The supernatant

obtained after centrifugation (16,000 × g for 15 min at 4 °C) was stored at –20 °C until enzymatic analysis. The concentration of soluble protein in aqueous extracts was determined by Bradford (1976) using bovine serum albumin (1 mg mL⁻¹) as a standard.

Total alkaline protease activity was measured using azocasein (0.5%) in 100 mM Tris–HCl buffer, pH 9.0 as described Alarcón et al. (2007). Units of alkaline protease activity (UA) were calculated using the equation: $UA = \Delta Abs_{366nm} \times V_{reaction} \times time^{-1} \times V_{enzyme}^{-1}$, where t is min of enzymatic reaction, and $V_{reaction}$ and V_{enzyme} are expressed in mL. Trypsin activity was assayed using BAPNA (N- α -benzoyl-DL-arginine 4-nitroanilide hydrochloride) as substrate according to Erlanger et al. (1961). Chymotrypsin activity in extracts was determined using SAPNA (N-succinyl-Ala-Ala-Pro-Phe p-nitroanilide) according to Delmar et al. (1979). Leucine aminopeptidase was determined using leucine p-nitroanilide (0.1 mM in DMSO) as substrate, according to Maraux et al. (1973). For trypsin, chymotrypsin and leucine aminopeptidase activities one unit of enzyme activity was defined as 1 μ mol p-nitroanilide released per minute using a coefficient of molar extinction of 8.8 at 410 nm. Determination of α -amylase activity was carried out using 2-chloro-p-nitrophenyl- α -D-maltotriose as substrate, and rate of formation of the colored 2-chloro-p-nitrophenol was monitored kinetically at 405. One unit of enzyme activity was defined as 1 μ mol of 2-chloro-p-nitrophenol released per minute using a coefficient of molar extinction of 12.9. Alkaline phosphatase activity was assayed using 4-nitrophenyl phosphate in 1 M diethanolamine, 1 mM MgCl₂ buffer (pH 9.8) according to Bergmeyer (1974). One unit was defined as 1 μ g nitrophenyl released per minute using a coefficient of molar extinction of 18.5 at 405 nm. Except for total alkaline protease activity, the remaining enzymatic assays were adapted to microplate. All assays were performed by triplicate at 25 °C. Digestive enzyme activities were expressed as U mg protein⁻¹ and U larva⁻¹ using the total number of larvae in each homogenized pooled sample.

Additionally, biochemical analysis of total alkaline protease was complemented with a study of intestinal protease isoforms. For this purpose, sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) of enzyme preparation from different larval ages was carried out in Mini Protean II chamber (Bio-Rad) according to Laemmli (1970) using 8 × 10 × 0.075-cm gels. The samples were prepared and the zymogram of alkaline protease activities was obtained as described by García-Carreño et al. (1993) as modified by Alarcón et al. (1998).

2.7. Statistical analysis

All data of growth, biochemical composition and intestinal enzyme activities are presented as means ± SEM. The Pearson coefficient of variation (CV) was studied at 23, 56, 87 and 119 dah, with the formula: (treatment standard deviation/treatment mean) × 100 (Sokal and Rohlf, 1981) to determine inter-individual length variation within the same treatment. After testing for normality (Kolmogorov–Smirnov test), a one-way ANOVA was performed to detect statistically significant differences in growth, biochemical composition and enzymatic activities between treatments ($P < 0.05$). In those cases where significant differences were found, a Tukey and Games–Howell post-hoc comparison test (at $\alpha = 0.05$) was applied. Data identified as non-homogeneous (Levene's test) were normalized appropriately prior to analysis. For data without homogeneous variances after normalization, a more conservative post-hoc test was considered. All statistical analyses were performed using the SPSS v 21 software.

For digestive microbiota studies the DGGE banding patterns obtained were analyzed using FPQuest Software version 4.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A matrix of similarities for the densitometric curves of the band patterns was calculated using the Pearson coefficient which considers the location of the bands and their intensities. Clustering of DGGE patterns was achieved by construction of dendrograms using the Unweighted Pair Groups Method using Arithmetic Averages (UPGMA). The Pearson similitude coefficients

obtained for each treatment were compared using Multiple Range Tests for similarity by diet.

A principal component factor analysis (PCA) was applied to correlate the variables determining growth, body composition, enzyme activity and intestinal microbiota species of sole fish at early stages of development. Kaiser–Meyer–Olkin measures of sampling adequacy and Bartlett's Test of Sphericity (testing the null hypothesis where the original correlation matrix is an identity matrix) were computed for PCA in order to test the validity of the data set. Cumulative proportion of variance criterion was employed in determining the number of factors to extract. The varimax criterion of the orthogonal rotation method was employed for the rotation of the factor matrix. The software used for all these analyses was IBM SPSS Statistics V.20.

3. Results

Growth of larvae (measured as total length and dry weight of fish) was significantly higher after *S. putrefaciens* Pdp11 administration from 10 to 30 dah, as shown in Fig. 1. The probiotic bioencapsulation in *Artemia* metanauplii did not affect survival (88.05–89.83%), but reduced sole growth heterogeneity (Table 1).

Protein and lipid contents of live prey utilized in the feeding trial are summarized in Table 2 where a trend for increasing total protein and lipid content in *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 was observed. Specifically, lipids were higher ($P < 0.05$) in *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 compared to Control *Artemia* (20.5 vs 17.3%). With regard to larval body composition, a clear increment of larval individual nutrient content with age was found after *S. putrefaciens* Pdp11 treatment. For instance, at day 56 after hatching, Pdp11 larvae contained 25.08 mg protein larva⁻¹ compared with 20.05 mg larva⁻¹ of Control fish. Similarly, at 87 dah Pdp11 group was also significantly richer in fat content (13.56 vs 10.10 mg larva⁻¹ for probiotic and Control, respectively) (Fig. 2).

The PCR-DGGE clusters corresponding to sole digestive microbiota at the different sampling days are presented in Fig. 3. A band corresponding to *S. putrefaciens* Pdp11 was sequenced from 23 to 119 dah only in probiotic fish, representing an average intensity of 12.5%, 8%, 5% and 4%, respectively of total intensity showed by all bands of PCR-DGGE patterns. There was a significant gut microbiota modulation in specimens fed *S. putrefaciens* Pdp11-supplemented *Artemia* compared with those fed Control *Artemia*, this effect being especially consistent at 56 and 87 dah. In this way, PCR-DGGE patterns were clustered in two clear groups, one including control fish (similarity percentage about 40%) and the other corresponding to specimens fed the probiotic diet (similarity percentage about 50%).

S. putrefaciens Pdp11 strain displayed positive for five arylamidase activities (alanyl-phenylalanyl-proline, glutamyl β -naphthylamide, L-proline, tyrosine and glutamyl-glycyl-arginine). Lipase, N-acetyl β -glucosaminidase, phosphatase, succinate alcalinization and Ellman were also positive (Table 3).

Regarding sole larvae, specific and individual enzyme activities showed the same pattern in both experimental groups, with statistical differences ($P < 0.05$) when values were compared among different ages (Fig. 4). However, no difference in the general developmental pattern was observed between both treatments. One way, specific activities (U mg protein⁻¹) progressively increased from 23 to 56 dah, reaching a peak at day 56, and then gradually decreased in older fish. In the other, individual activities (U larva⁻¹) showed a profile characterized by a gradual increase with larval age reaching the maximum value at 119 dah.

When comparing enzyme activities for each sampling day, it was found at day 30 that specific alkaline protease and chymotrypsin activities were significantly higher in larvae fed *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 than fish fed Control *Artemia* (Fig. 4a and c). However, when weaning started (56 dah) no difference was found between both experimental groups. At day 56, mean values of specific trypsin

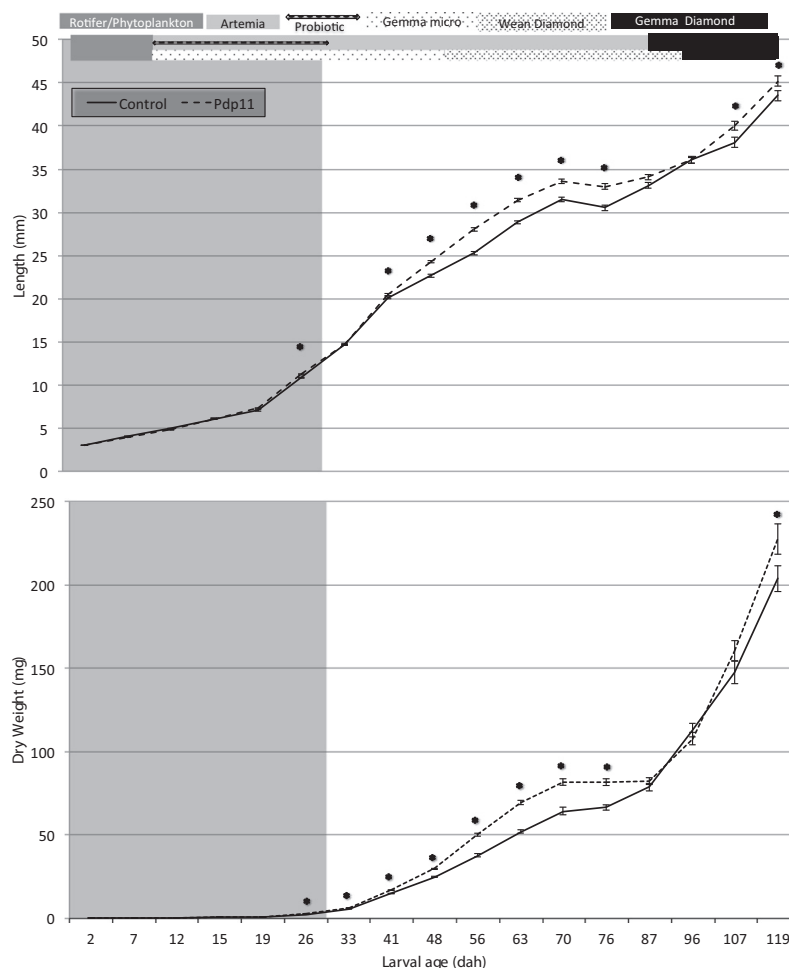


Fig. 1. Feeding protocol and larval growth in (a) total length (mm) and (b) dry weight (mg) of Senegalese sole larvae fed Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia* (10–30 dah). Values are mean \pm SEM of triplicate determination. Asterisk (*) for the same sampling day denotes significant differences between treatments ($P < 0.05$).

activity were higher in the Pdp11 group but they were not statistically different from Control group (Fig. 4b). Trypsin and chymotrypsin individual activities of larvae fed *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 were higher than those of Control group, but without a statistically significant difference ($P > 0.05$). α -Amylase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase activities were not influenced by the addition of *S. putrefaciens* Pdp-11 (Fig. 4d, e and f). After weaning (87 dah), specific activity of α -amylase and alkaline phosphatase in both experimental groups increased, reaching similar values to 56 dah larvae.

The zymogram of alkaline proteases showed the same pattern of active fractions in both experimental groups (Fig. 5). Evidence of the disappearance of the two active bands with the lowest molecular masses at 87 dah was apparent. The remaining active fractions were similar to those detected in *S. senegalensis* juveniles (30 g body weight).

The varimax results of the PCA evaluating the relationship among several are shown in Fig. 6. The three main axes accounted for a total variance of 80.32–91.04% (Table 4). They vary along sole larviculture (23, 56, 87 and 119 dah) but clearly separate fish of both experimental

treatments. The first principal axis compiled between 52.78 and 65.95% of the variance, depending on the sole age. It was related to some intestinal microbiota linked to *S. putrefaciens* Pdp11, and a subsequent enhanced chymotrypsin activity. These *S. putrefaciens* Pdp11 associated microorganisms were not detected in Control fish nor were they present in low concentrations, showing also a lower level of the mentioned proteolytic enzymes (Table 5). The second and third axes of the PCA analysis are linked to other microorganisms and enzyme activities not associated with *S. putrefaciens* Pdp11 administration. They contributed to variance with 13.59–20.04% and 9.29–11.97%, respectively.

4. Discussion

Probiotics have been reported as fish larvae growth promoters in *Solea solea* (Avella et al., 2011) and *Epinephelus coioides* (Sun et al., 2013). In this way a previous study with *S. putrefaciens* Pdp11 supplied in a longer pulse (10–86 dah) improved final growth in *S. senegalensis* larvae (Lobo et al., 2014). The present study demonstrated that a short probiotic pulse (10–30 dah) is enough to significantly improve growth

Table 1
Survival and size variability of Senegalese sole specimens fed Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia* (10–30 dah). Different letters denote significant difference ($P \leq 0.05$) among treatments (mean \pm SEM).

	2 DAH	26 DAH	41 DAH	56 DAH	87 DAH	119 DAH
	Control	Control	Control	Control	Control	Control
	Pdp11	Pdp11	Pdp11	Pdp11	Pdp11	Pdp11
Length dispersion	4.29 \pm 0.04	4.89 \pm 0.04	4.77 \pm 0.73	4.76 \pm 0.29	12.9 \pm 0.4 ^a	15.6 \pm 1.5 ^a
Survival %	–	97.8 \pm 0.2	97.5 \pm 0.3	96.7 \pm 0.9	97.0 \pm 0.1	89.8 \pm 0.7
						88.1 \pm 1.3

performance of sole during their ontogenetic development. The positive nutritional effect detected during early stages might persist along the trial as it has been described in Atlantic halibut *Hippoglossus hippoglossus* (Naess and Lie, 1998) and other flatfish species (Damaso-Rodríguez et al., 2010). Growth obtained in the present study was higher than those registered by Cañavate and Fernández-Díaz (1999) and Ribeiro et al. (2005) in sole postlarvae, but slightly lower than those reported by Engrola et al. (2007), which might be due to the higher rearing temperature utilized by these authors (21 °C).

Enhancing larval development is a relevant characteristic of probiotic utilization in fish aquaculture (Avella et al., 2010). The significantly higher length detected after the end of metamorphosis for Pdp11 larvae has been previously linked to an advanced metamorphosis (Lobo et al., 2014). Similar findings have been reported in *Perca fluviatilis* larvae with a mix of three *Bacillus* sp. (Mandiki et al., 2011). In addition a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 might contribute to producing not only an advanced, but a more synchronized metamorphosis in sole larviculture.

The size dispersion obtained in the present study was lower than that described in other flatfish species (Lee et al., 2000) including *S. senegalensis* (Engrola et al., 2005, 2007). In this sense a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 contributes to reducing handling activities and labor costs related to size grading in sole culture, with the consequent advantage for future juvenile performance.

S. putrefaciens Pdp11 administration did not enhance survival as described for other probiotics applied to farmed fish (Tinh et al., 2008). Likewise, our survival values were higher than those reported by other authors for the same species (Cañavate and Fernández-Díaz, 1999; Lobo et al., 2014; Ribeiro et al., 2005).

Fish fed *S. putrefaciens* Pdp11 *Artemia* showed higher levels of intestinal proteolytic activities than Control fish up to weaning. This effect has been also detected in sole juveniles fed *S. putrefaciens* Pdp11 supplied in feed (Sáenz de Rodrigáñez et al., 2009). A stimulation of digestive enzyme activity after the use of different probiotics in fish culture was also described (Suzer et al., 2008). The higher proteolytic activity level in Pdp11 group close to weaning might be related to the higher growth observed as a consequence of a more efficient inert diet utilization, as has been reported by probiotic administration in *A. persicus* (Askarian et al., 2011) and *Ctenopharyngodon idella* (Wu et al., 2012), respectively. The replacement of live prey by inert diets frequently produces a reduction in sole postlarvae growth rates linked to the new feed digestion (Engrola et al., 2007; Ribeiro et al., 2005) as is observed in this study. Results obtained show a progressive increase in larval enzyme activity, together with a progressive decrease in the specific activity of almost all the digestive enzymes after day 56. Since both experimental groups showed the same pattern of variation, it can be deduced that these changes are genetically programmed as a consequence of fish development (Henning, 1987). A zymogram of alkaline protease activity in *S. senegalensis* larvae showed the same profile of active fractions in both groups through the experimental period. Active isoforms with the lowest molecular masses visualized at days 23, 30 and 56 turn off after completion of weaning (day 87). This result matches with the above mentioned decrease in specific activity levels observed close to the weaning period. At 87 dah the zymogram is similar to those detected in juvenile specimens, which confirms the end of the maturation process of intestinal proteases in this species. Results confirmed that a short pulse of *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 throughout *S. senegalensis* larviculture increases the amount but does not modify the composition of intestinal proteases secreted into the intestinal lumen. Thus the inclusion of additives, such as *S. putrefaciens* Pdp11, to improve nutrient digestion of inert diets will be of interest for the sole industry in the future.

Fish larvae are characterized by an extremely rapid growth coupled with high demands for energy and structural components (Sargent et al., 2002). Lipid levels and protein/lipid ratio in Control *Artemia* used in the present study were similar to those of sole hatcheries (Bogliolo et al., 2012; Morais et al., 2006). Moreover, the chemical inert

Table 2

Protein and lipid content ($\text{g } 100^{-1}$ g dry weight) of Control and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia* (mean \pm SEM). Different lowercase letter denotes significant differences ($P \leq 0.05$) between treatments.

	Live prey	
	Control <i>Artemia</i>	Pdp11 <i>Artemia</i>
Crude protein	36.4 \pm 0.3	40.5 \pm 1.1
Crude lipid	17.3 \pm 0.2 ^a	20.5 \pm 0.2 ^b
Protein/lipid rate	2.11 \pm 0.00	1.98 \pm 0.04

diet composition utilized in this trial was similar to that usually administered in *S. senegalensis* facilities (Rema et al., 2008). Proteolytic activities detected in *S. putrefaciens* Pdp11 strain might be responsible for the higher protein digestion and absorption observed in both *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 and corresponding fed larvae leading to a subsequent better larval growth and advanced metamorphosis. In relation to the significantly higher lipid levels of *Artemia* supplemented with probiotic metamorphosis might be also facilitated by this initial energetic input, the corresponding protein sparing effect (Li

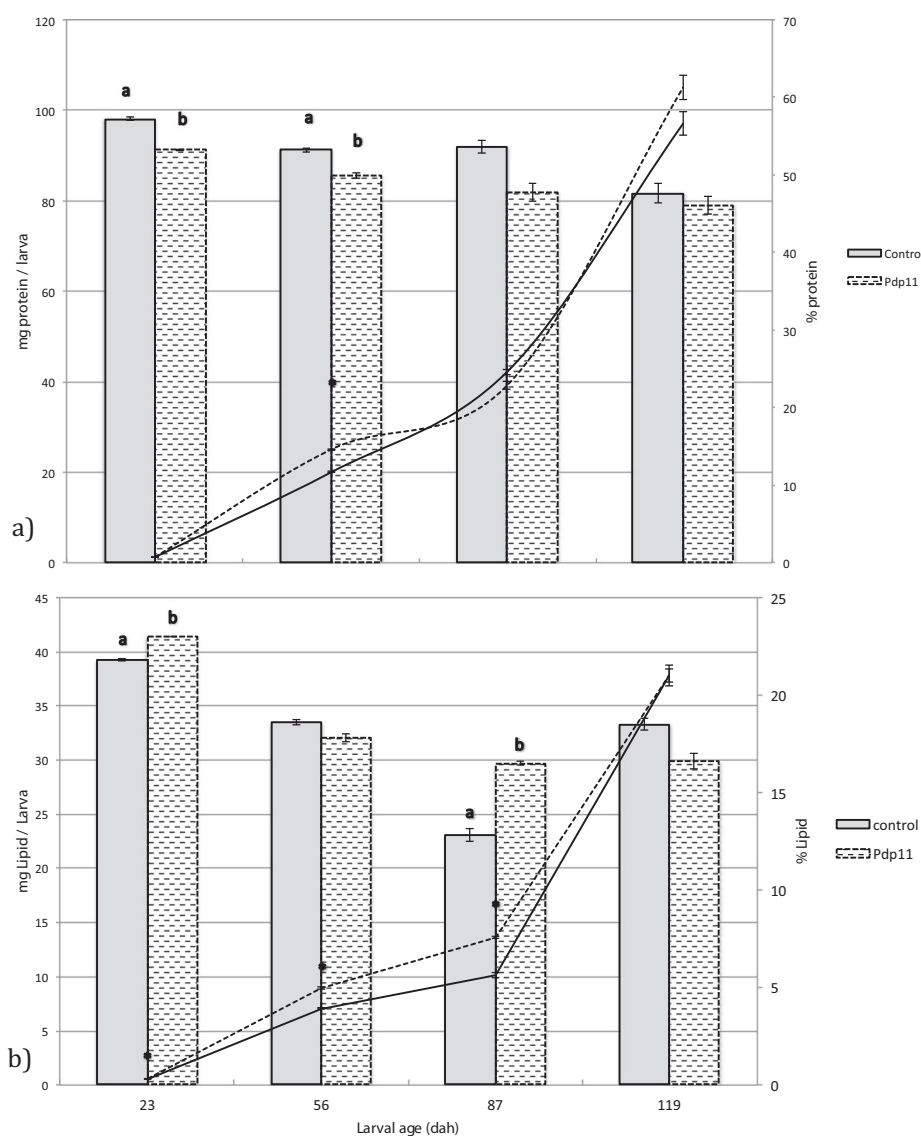


Fig. 2. Protein (a) and lipid (b) content ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$ dry weight and $\text{mg } \times \text{larvae}^{-1}$) of Senegalese sole specimens fed Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia*. Values are mean \pm SEM of triplicate determination. Different lowercase letters and asterisks (*) for the same sampling day denote significant differences between treatments ($P \leq 0.05$).

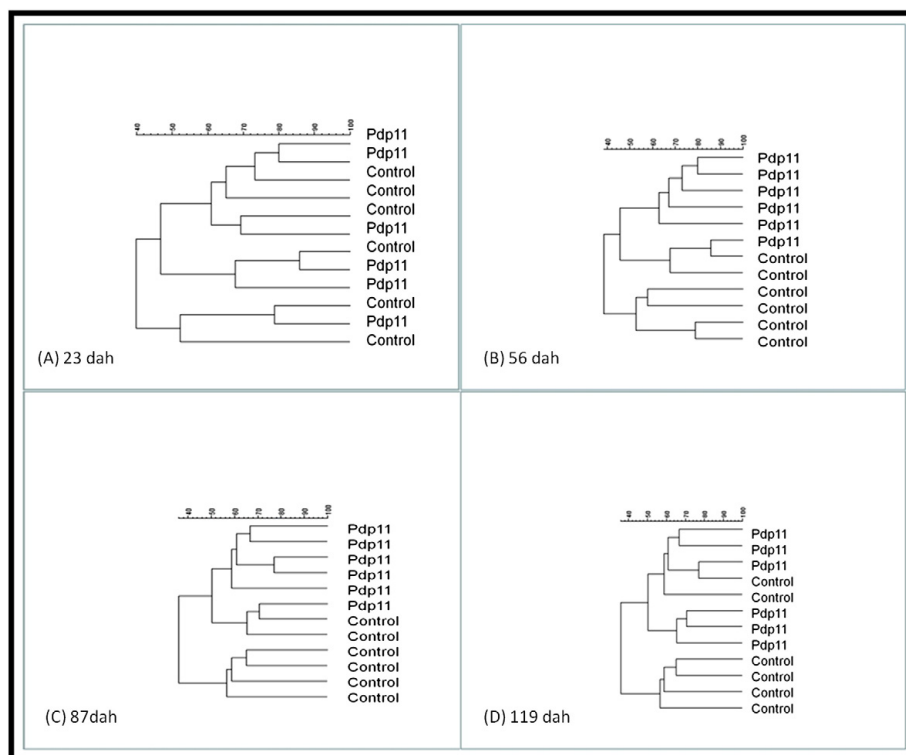


Fig. 3. PCR-DGGE clustering computed on similarity Pearson coefficients of intestinal microbiota of Senegalese sole specimens at different sampling days: A) 23 dah, B) 56 dah, C) 87 dah, and D) 119 dah. Experimental treatments are fish fed Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia*.

et al., 2012; Rodríguez et al., 2009) and a consequent advanced and sustained growth. Lipase activity detected in *S. putrefaciens* Pdp11 strain and probably that of sole larvae, stimulated by the higher lipid level of *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11, enhanced fish metabolism and growth. In this sense an increase of lipase activity and growth has been reported when lactic acid bacteria were supplied to Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) (Askarian et al., 2011). Both protease and lipase activities detected in *S. putrefaciens* Pdp11 strain might be considered an interesting characteristic for probiotic uses. In this context an increase in proteolytic activities and an improvement of the nutritive condition of *Artemia* related to probiotic digestion linked to a microbiota modulation has been reported (Verschuere et al., 1999; Ahmadian-Motladi et al., 2012).

S. putrefaciens Pdp11 highly modulated larval and fry gut microbiota as has also been reported in sole juveniles (Tapia-Paniagua et al., 2012). Microbiota modulation by oral probiotic bacteria has also been reported in turbot (*Scophthalmus maximus*) (Ringo, 1999), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Robertson et al., 2000) and grouper (*E. coioides*) (Sun et al., 2013). The DGGE patterns obtained from the intestinal microbiota of 56 and 87 dah postlarvae showed a clear trend to cluster the fish fed probiotic diet, whereas this trend was less accentuated at 23 and 119 dah. Our results might indicate that a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 produces a steering effect towards a stabilization of the intestinal microbiota of sole larvae, especially at weaning period (56 to 87 dah). Our findings are in agreement with that observed by De Schryver et al. (2010), who also reported a requirement of a transient time to establish

Table 3

Enzymatic profile potential of the probiotic *Shewanella putrefaciens* Pdp11 deduced from the ID-GNB Vitek 2 (Biomérieux, Marcy L'Etoile, France) test.

Enzyme activity	Reaction catalyzed/physiological function	Quantity (mg)
Ala-Phe-Pro-arylamidase	Exoprotease that facilitates the liberation of peptides with Ala-Phe-Pro terminal sequence from proteins.	0.0384
B-N-acetyl-glucoaminidase (Chitinase)	Enzyme that liberates N-acetylglucosamine	0.0408
Glutamyl arylamidase pNA	Exoprotease that liberates peptides with Glu terminal from proteins	0.0324
L-Proline-arylamidase	Exoprotease that liberates peptides with Pro terminal from proteins	0.0234
Tyrosine arylamidase	Exoprotease that liberates peptides with Tyr terminal from proteins	0.0276
Glu-Gly-Arg-arylamidase	Exoprotease that facilitates the liberation of peptides with Glu-Gly-Arg terminal sequence from proteins.	0.0376
Lipase	Activity involved in lipid digestion hydrolyzing esters of glycerol with preferably long chain fatty acids	0.0192
Phosphatase	Enzyme involved in nutrition and mineralization processes increasing phosphorus bioavailability	0.0504
Succinate alcalinization	Activity relieving acidic stress from aminoacid metabolism	0.15
Ellman	It indicates the presence of free thiols in the probiotic strain. It confers protein stability and protection against oxidative stress	0.03

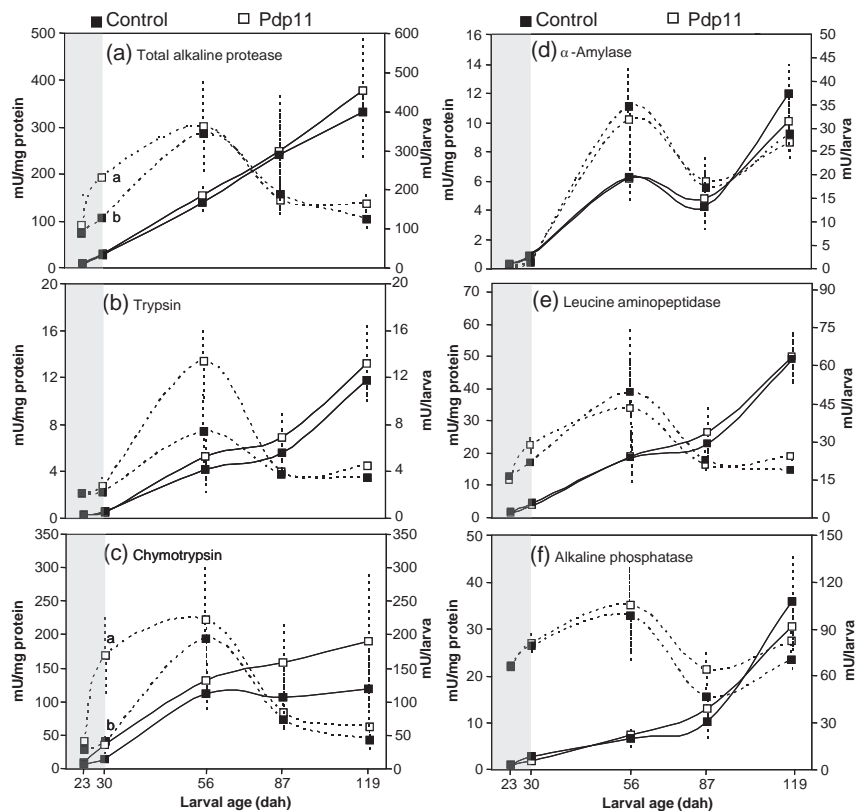


Fig. 4. Evolution of digestive enzymatic activities (total alkaline protease, trypsin, chymotrypsin, amylase, leucine aminopeptidase and alkaline phosphatase) in gut homogenates of Senegalese sole specimens at 23, 30, 56, 87 and 119 dah. Experimental treatments are Control *Artemia* (■) and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia* (□) from 10 to 30 dah. Dashed and continuous lines represent specific (U/mg protein) and individual (U/larvae) enzyme activities, respectively. Values are mean \pm SEM of triplicate determination. Different lowercase letters for the same sampling day denote significant differences between dietary treatments ($P < 0.05$).

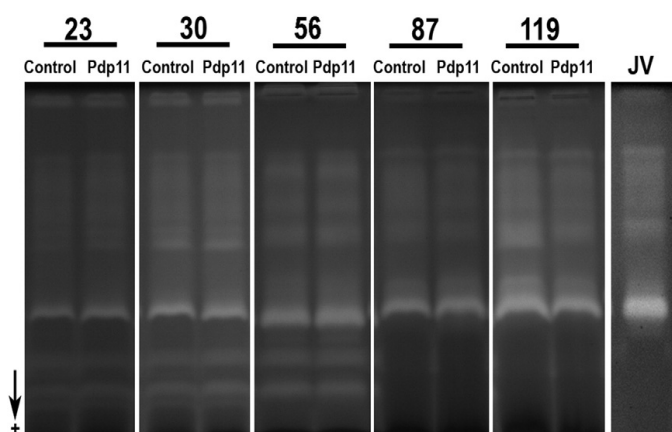


Fig. 5. Zymogram on total proteolytic activity from pooled Senegalese sole larval gut extracts at 23, 30, 56, 87 and 119 dah. For comparative purpose, lane JV shows the pattern of intestinal proteases obtained from a juvenile specimen (30 g).

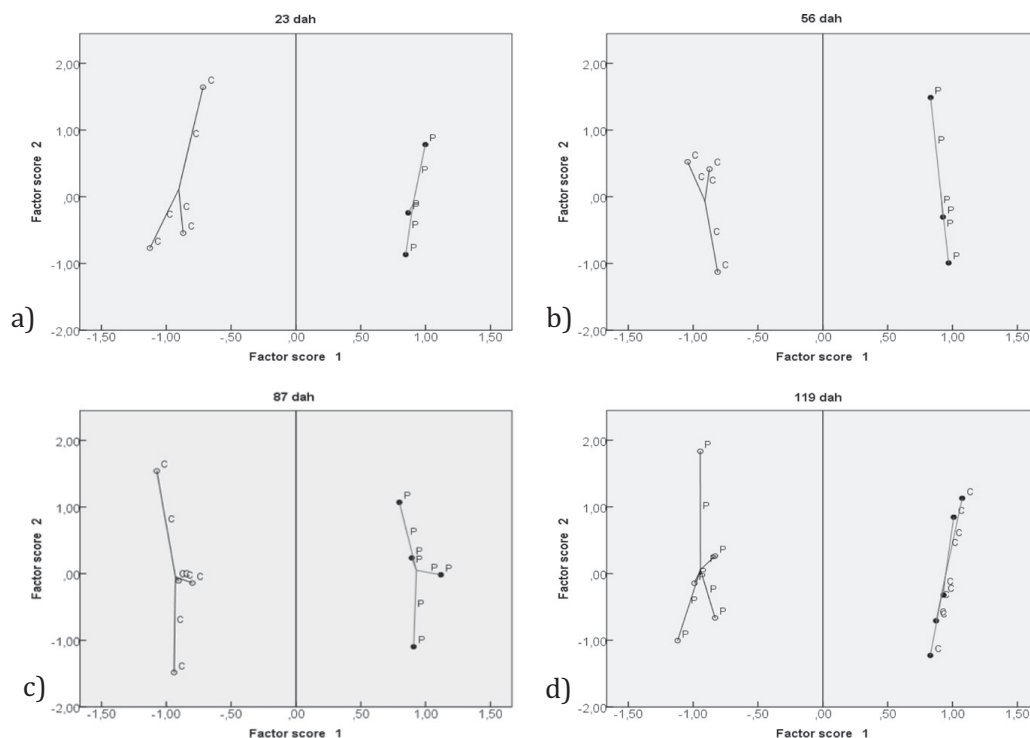


Fig. 6. Effect of Control Artemia and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented Artemia on Senegalese sole culture variables (total length, dry weight, protein and lipid content, digestive enzymatic activities and gut microbiota) defined by the PCA axes (23, 56, 87 and 119 dah).

functional microbial community in juvenile seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed with a diet supplemented with poly- β -hydroxybutyrate (PHB). Likewise a lower band pattern similarity was observed at 119 dah that might indicate a lower *S. putrefaciens* Pdp11 effect at this age, three months after probiotic administration. However a band corresponding to *S. putrefaciens* Pdp11 was sequenced from 23 to 119 dah only in Pdp11 fish. This fact confirms the capability of long-term gut colonization for this probiotic strain reported in a previous study (Lobo et al., 2014). This gut colonization ability at first stages of *S. senegalensis* (23 dah) culture when digestive tract is not fully developed (Padrós et al., 2011; Ribeiro et al., 1999) seems relevant in relation to immune and nutritive condition of specimens. In this context similar gut colonization competence has been previously described for several probiotic species supplied to farmed fish (Sun et al., 2013; Tinh et al., 2008). The changes observed in the intestinal microbiota at 56 and 87 dah may also be related with the increase of weight and length of sole detected in our study. A similar relationship between intestinal microbiota and growth of fish fed probiotics and prebiotics have been reported in seabass (*D. labrax*) and grouper (*E. coioides*) by several authors (Carnevali et al., 2006; De Schryver et al., 2010).

A diversified microbiota was observed in the digestive system of sole larvae and fry along the culture after sequencing of larval extracted DNA. This fact was related with both diets (live and inert) and sole developmental stage. Moreover probiotic supply of *S. putrefaciens* Pdp11 strongly determined specific gut microbiota composition in relation to Control. Microbiota modulation may be a beneficial characteristic for fish gut avoiding the presence of opportunistic and pathogen bacteria

(Yang et al., 2012) and developing an enhanced immune response (Picchiatti et al., 2007; Taoka et al., 2006). In this context, it is worthpointing out the absence or lower frequency of the pathogenic bacteria *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* (Zarza and Padrós, 2008) in fish fed *S. putrefaciens* Pdp11. Moreover it is interesting to emphasize the presence of probiotic strains like *Lactobacillus helveticus* in the gut of *S. putrefaciens* Pdp11 fish. A more detailed gut microbiota study has been carried out to compare the relationship between diets (Control and probiotic) and intestinal bacteria along sole first developmental stages.

A PCA analysis, including all the parameters analyzed, strongly differentiated fish fed with probiotic from Control fish. There was a microbiota selection carried out by live feed supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 linked to an enhanced enzymatic activity. Both

Table 4
Variance accounted for the PCA axes of Senegalese sole larval and fry parameters (23, 56, 87 and 119 dah).

Components				Total
	1	2	3	
Culture day	% variance			
23 dah	64.1	15.3	9.29	88.7
56 dah	58.8	20.0	12.0	90.8
87 dah	66.0	13.6	10.5	90.0
119 dah	52.8	15.7	11.5	80.0

Table 5

Eigenvalues and loading factor after varimax rotation of sole larvae and fry fed Control *Artemia* and *S. putrefaciens* Pdp11 supplemented *Artemia* at 23, 56, 87 and 119 dah. Bold letters indicate loading factors higher than 0.80.

Component Variable	23 dah			56 dah			87 dah			119 dah		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Length	0.98	−0.14	0.00	1.00	0.05	−0.04	0.99	0.05	−0.10	−0.94	0.14	0.26
Dry weight	0.96	−0.25	−0.10	1.00	0.06	−0.04	0.98	0.06	−0.12	−0.91	0.04	0.25
Protein %	−0.76	−0.52	−0.09	−0.80	0.13	−0.32	−0.43	0.00	0.82	0.27	0.03	−0.74
mg protein/larva	0.29	−0.83	−0.03	0.94	0.20	−0.19	−0.18	0.01	0.88	−0.23	0.07	−0.79
Lipid %	0.89	−0.25	0.31	−0.18	0.14	0.03	0.91	0.06	0.15	0.50	−0.29	0.69
mg lipid/larva	0.96	−0.18	0.18	0.90	0.15	−0.05	0.94	0.07	0.11	−0.05	−0.31	0.82
T_Protein/lipid	−0.92	−0.23	−0.21	−0.42	−0.02	−0.25	−0.88	0.00	0.21	−0.16	0.18	−0.92
T_mU/mg protein	0.14	0.87	0.12	0.15	0.95	0.21	0.05	0.90	0.16	−0.34	0.68	0.22
T-mU/larva	0.11	0.71	−0.21	0.15	0.94	0.30	0.08	0.88	−0.46	−0.12	0.83	−0.06
Q-mU/mg protein	0.85	0.34	0.21	0.10	0.98	−0.04	0.19	0.88	0.32	−0.12	0.86	0.16
Q-mU/larva	0.91	0.18	0.09	0.18	0.98	0.06	0.19	0.92	−0.33	−0.10	0.92	0.07
A-mU/mg protein	0.39	0.47	0.69	−0.18	0.96	−0.14	−0.03	0.41	−0.79	0.26	0.65	−0.35
A-mU/larva	−0.23	0.69	0.63	−0.10	0.86	−0.07	0.01	0.62	−0.74	0.12	0.87	−0.41
FA-mU/mg protein	−0.02	0.90	0.43	0.05	0.71	0.60	0.49	0.28	0.31	−0.42	0.57	0.31
FA-mU/larva	−0.31	−0.23	−0.85	0.15	0.55	0.78	0.15	0.73	−0.45	−0.09	0.87	0.12
LA-mU/mg protein	−0.28	0.76	0.45	−0.06	−0.17	0.92	−0.17	−0.05	0.30	−0.48	0.22	0.35
LA-mU/larva	−0.57	0.45	0.14	0.06	−0.30	0.94	0.06	0.69	−0.67	−0.02	0.74	−0.27
PA-mU/mg protein	0.68	−0.33	0.66	0.00	0.98	0.02	−0.17	0.93	0.13	−0.14	0.76	0.35
PA-mU/larva	0.63	−0.71	0.32	0.10	0.97	0.15	−0.07	0.91	−0.39	−0.02	0.94	0.11
<i>Pseudomonas</i>	−0.99	0.12	−0.07	1.00	0.07	−0.03				0.50	0.36	0.14
Marine bacterium B37	−0.99	0.12	−0.07	1.00	−0.07	0.03				1.00	−0.06	0.06
<i>Enterobacter</i> sp. 11H	0.24	0.46	−0.80	1.00	−0.07	0.03				1.00	−0.06	0.06
<i>Halomonas</i> sp. AMP12	−0.99	0.12	−0.07	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Acinetobacter</i> sp. MBL 11-0202	0.99	−0.12	0.07	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	0.83	0.09	−0.03
<i>Brevibacillus paravebris</i> DYJK58	0.99	−0.12	0.07	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Mycoplasma microti</i> IL371	0.99	−0.12	0.07	1.00	−0.07	0.03				1.00	−0.06	0.06
<i>Rhodococcus erythropolis</i> H11	−0.35	0.80	−0.17				0.99	0.05	−0.10	0.73	−0.23	0.05
Uncultured <i>Mycoplasma</i> sp. Kb.1	−0.99	0.12	−0.07				0.99	0.05	−0.10	−0.82	−0.01	−0.14
<i>Pseudomonas</i> sp. FG-12b				1.00	0.07	−0.03	−0.77	0.36	0.43	0.65	−0.10	−0.16
<i>Acinetobacter</i> sp. CmNA3	−0.99	0.12	−0.07	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Enterobacter</i> sp. CC-SN15-5	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.08	−0.01	0.77	1.00	−0.06	0.06
<i>Bacterium</i> A119	0.99	−0.12	0.07	0.41	0.73	−0.29	−0.99	−0.05	0.10	−0.67	−0.17	−0.06
<i>Geobacillus</i> sp. V1W70BklI	0.55	0.38	−0.70	1.00	−0.07	0.03	−0.73	−0.48	0.21	−0.64	−0.23	−0.19
<i>Rhodococcus</i> sp. TM1	−0.99	0.12	−0.07	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Klebsiella</i> sp. PG4-2	−0.35	0.80	−0.17	0.31	−0.30	0.50	−0.77	0.36	0.43	1.00	−0.06	0.06
<i>Anoxybacillus</i> sp. D503				−0.74	0.36	0.32	−0.99	−0.05	0.10	−0.08	−0.59	0.31
<i>Vibrio</i> sp. DMS01				−0.43	0.20	0.85	−0.99	−0.05	0.10	−0.08	−0.59	0.31
<i>Vibrio campbelli</i> HNS034	−0.99	0.12	−0.07	−0.74	0.36	0.32	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Photobacterium damsela</i> subsp piscicida pRDA19	−0.99	0.12	−0.07	−0.43	0.20	0.85	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Vibrio natriegens</i> 01/252	−0.99	0.12	−0.07				0.59	0.33	0.14	−0.96	−0.07	−0.10
<i>Allivibrio</i> sp. SW5-1	−0.99	0.12	−0.07	−0.10	0.25	0.93	0.99	0.05	−0.10	0.29	−0.09	0.82
Uncultured <i>Anoxybacillus</i> sp. Kb-8	−0.99	0.12	−0.07				−0.99	−0.05	0.10			
<i>Candidatus arthromitus</i> sp. SFB-rat-Yit	−0.43	−0.27	−0.63	−0.73	0.50	−0.20	0.62	0.07	0.29	1.00	0.06	−0.06
<i>Candidatus arthromitus</i> sp. SFB-rat-Yit	−0.99	0.12	−0.07							−0.77	0.28	−0.37
<i>Pseudomonas</i> sp. Iso-13	0.66	−0.43	−0.10	1.00	−0.07	0.03	0.99	0.05	−0.10	0.93	−0.16	−0.01
<i>Bacterium</i> PJ-35							0.99	0.05	−0.10	0.89	−0.18	−0.02
<i>Pseudomonas</i> sp. Ant-4	−0.36	0.00	0.09	1.00	−0.07	0.03	−0.99	−0.05	0.10	−0.03	0.37	0.68
Uncultured bacterium R4J7L4_B3	0.42	−0.12	0.28	0.41	0.73	−0.29	−0.99	−0.05	0.10	1.00	−0.06	0.06
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5329	−0.77	−0.51	0.06	1.00	0.07	−0.03	−0.89	0.11	0.19			
Uncultured bacterium ncd89b06c1	0.72	0.21	0.40	1.00	0.00	−0.08	−0.99	−0.05	0.10	0.76	0.09	0.21
Uncultured bacterium BR01AD06				1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Candidatus arthromitus</i>	0.72	0.21	0.40				0.99	0.05	−0.10	−0.44	−0.11	−0.73
<i>Lactobacillus helveticus</i> GIMC23:KSN	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Pseudomonas acephalica</i> Ind01	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> qdJSVp001	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10			
<i>Shewanella putrefaciens</i> pdp11	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Shewanella</i> ANA	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06
<i>Vibrio</i> sp. Pelg0901	0.99	−0.12	0.07	1.00	0.07	−0.03	0.99	0.05	−0.10	1.00	0.06	−0.06

conditions resulted in a better growth performance along sole larval and fry culture.

5. Conclusion

In conclusion a short pulse of *S. putrefaciens* Pdp11 (10–30 dah) seems sufficient to obtain a suitable microbial modulation involved in digestive enzyme stimulation and growth and body composition enhancement. Moreover size variability was smaller from metamorphosis

until the end of weaning for probiotic fish. Both the enhancement of the nutritive condition and the lower size variability observed in fish related to *Artemia* supplemented with *S. putrefaciens* Pdp11 diet hold great potential for sole aquaculture. These results emphasize the need to develop tailor-made probiotic solutions for successful larviculture.

Conflict of interest

This research does not present conflicts of interest.

Financial support

This work was supported by the Spanish National Development Plan for Sole farming (JACUMAR) and the Ministry of Science and Technology (AGL 2011-30381-C03-02 and AGL2010-20052), and ERDF funds.).

Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the assistance of the Spanish Oceanography Institute staff. We are also grateful to the EULEN/FERROSER employees and especially to Javier Revilla, Mar Oria and Mar Díaz for their assistance. Covadonga Rodríguez belongs to the Institute of Biomedical Technologies (ITB) of the Canary Islands.

References

- Ahmadnia-Motlath, H., Farhangi, M., Rafiee, G., Noori, F., 2012. Modulating gut microbiota and digestive enzyme activities of *Artemia urmiana* by administration of different levels of *Bacillus subtilis* and *Bacillus licheniformis*. *Aquac. Int.* 20 (4), 693–705.
- Alarcón, F.J., Díaz, M., Moyano, F.J., Abellán, E., 1998. Characterization and functional properties of digestive proteases in two sparids; gilthead seabream (*Sparus aurata*) and common dentex (*Dentex dentex*). *Fish Physiol. Biochem.* 19, 257–267.
- Alarcón, F.J., De Oña, C., Díaz, M., García-Carreño, F.L., Moyano, F.J., Navarrete del Toro, M.A., 2007. The effect of proteinase inhibitors in food protein hydrolysis by digestive proteinases of white shrimp (*Penaeus vannamei*) larvae. *J. Sci. Food Agric.* 87, 120–126.
- Aliyu-Paiko, M., Hashim, R., Shu-Chien, A.C., 2010. Influence of dietary lipid/protein ratio on survival, growth, body indices and digestive lipase activity in snakehead (*Channa striatus*, Bloch 1793) fry reared in re-circulating water system. *Aquac. Nutr.* 16 (5), 466–474.
- Altschul, S.F., Gish, W., Miller, W., Myers, E.W., Lipman, D.J., 1990. Basic local alignment search tool. *J. Mol. Biol.* 215, 403–410.
- Askarian, F., Kousha, A., Salma, W., Ringo, E., 2011. The effect of lactic acid bacteria on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquac. Nutr.* 17 (5), 488–497.
- Avella, M.A., Olivotto, I., Silvi, S., Place, A.R., Carnevali, O., 2010. Effect of dietary probiotics on clownfish: a molecular approach to define how lactic acid bacteria modulate development in a marine fish. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 298 (2), 359–371.
- Avella, M.A., Olivotto, I., Silvi, S., Ribeco, C., Cresci, A., Palermo, F., Polzonetti, A., Carnevali, O., 2011. Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture* 315, 384–393.
- Bergmeyer, H.V., 1974. Phosphatases. *Methods of enzymatic analysis*, vol. 2. Academic Press.
- Bligh, E.G., Dyer, W.J., 1959. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 37, 911–917.
- Bogliño, A., Gisbert, E., Darias, M.J., Estévez, A., Andree, K.B., Sarasquete, C., Ortiz-Delgado, J.B., 2012. Isopropylidic diets differing in their essential fatty acid profiles affect the deposition of unsaturated neutral lipids in the intestine, liver and vascular system of Senegalese sole larvae and early juveniles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol. Integr. Physiol.* 162 (1), 59–70.
- Borges, P., Oliveira, B., Casal, S., Dias, J., Conceicao, L.E.C., Valente, L.M.P., 2009. Dietary lipid level affects growth performance and nutrient utilization of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) juveniles. *Br. J. Nutr.* 102, 1007–1010.
- Bradford, M.M., 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72, 248–254.
- Cañavate, J.P., Fernández-Díaz, C., 1999. Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174, 255–263.
- Cara, J.B., Moyano, F.J., Zambonino-Infante, J.L., Alarcón, F.J., 2007. The whole amino acid profile as indicator of the nutritional condition in cultured marine fish larvae. *Aquac. Nutr.* 13, 94–103.
- Carnevali, O., Zamponi, M.C., Sulpizio, R., Rollo, A., Nardi, M., Orpiano, C., Silvi, S., Caggiano, M., Polzonetti, A.M., Cresci, A., 2004. Administration of Probiotic Strain to Improve Sea Bream Wellness during Development. *Aquaculture International* 12 (4), 377–386.
- Carnevali, O., de Vivo, L., Sulpizio, R., Gioacchini, G., Olivotto, I., Silvi, S., Cresci, A., 2006. Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax* L.), with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258, 430–438.
- Chabrilón, M., Rico, R.M., Arijo, S., Diaz-Rosales, P., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2005a. Interactions of microorganisms isolated from gilthead sea bream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J. Fish Dis.* 28, 531–537.
- Chabrilón, M., Rico, R.M., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2005b. Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J. Fish Dis.* 28, 229–237.
- Chen, Q., Yan, Q., Wang, K., Zhuang, Z., Wang, X., 2008. Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus. *Dis. Aquat. Org.* 80, 181–188.
- Conceicao, L.E.C., Ozório, R.O.A., Suur, E.A., Verreth, J.A.J., 1998. Amino acid profiles and amino acid utilization in larval African catfish (*Clarias gariepinus*): effects of ontogeny and temperature. *Fish Physiol. Biochem.* 19 (1), 43–58.
- Conceicao, L.E.C., Ribeiro, L., Engrola, S., Aragao, C., Morais, S., Lacuisse, M., Soares, F., Dinis, M.T., 2007. Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268, 64–81.
- Dámazo-Rodríguez, M.L., Pousao-Ferreira, P., Ribeiro, L., Coutinho, J., Bandarra, N.M., Gavaia, N., Morais, S., 2010. Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: effect on the performance of juvenile *Solea senegalensis*. *Aquac. Int.* 18, 741–757.
- De Schryver, P., Sinha, A.K., Kunwar, P.S., Baruah, K., Verstraete, W., Boon, N., De Boeck, G., Boissier, P., 2010. Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 86, 1535–1541.
- Delmar, E., Largman, C., Brodrick, J., Geokas, M., 1979. A sensitive new substrate from chymotrypsin. *Anal. Biochem.* 99, 316–320.
- Díaz-Rosales, P., Arijo, S., Chabrilón, M., Alarcón, F.J., Tapia-Paniagua, S.T., Martínez-Manzanares, E., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2009. Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 293, 16–21.
- Dias, D.C., Correa, C.F., Leonardo, A.F.G., Tachibana, L., Romagosa, E., Ranzani-Paiva, M.J.T., 2011. Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. *Acta Scientiarum* 33 (4), 365–368.
- Engrola, S., Conceicao, L.E.C., Gavaia, P.J., Cancela, M.L., Dinis, M.T., 2005. Effects of pre-weaning feeding frequency on growth, survival and deformation of senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup, 1858). *Isr. J. Aquacult. – Bamidgah* 57, 10–18.
- Engrola, S., Conceicao, L.E.C., Dias, L., Pereira, R., Ribeiro, L., Dinis, M.T., 2007. Improving weaning strategies for Senegalese sole: effects of body weight and digestive capacity. *Aquac. Res.* 38, 696–707.
- Erlanger, B., Kokowsky, N., Cohen, W., 1961. The preparation and properties of two new chromogenic substrates of trypsin. *Arch. Biochem. Biophys.* 95, 271–278.
- Fernández-Reiriz, M.J., Pérez-Camacho, A., Ferreira, M.J., Blanco, J., Planas, M., Campos, M.J., Labarta, U., 1989. Biomass production and variation in the biochemical profile (total protein, carbohydrates, RNA, lipids and fatty acids) of seven species of marine microalgae. *Aquaculture* 83, 17–37.
- Fulton, R.M., Nersessian, B.N., Reed, W.M., 2002. Prevention of *Salmonella enteritidis* infection in commercial ducklings by oral chicken egg-derived antibody or in combination with probiotics. *Poult. Sci.* 81 (1), 34–40.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Leon-Rubio, J.M., Tapia-Paniagua, S., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Moreno-Ventas, X., Lucas, L.M., Linares, F., Arce, F., Arijo, S., 2010. Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquaculture* 306, 281–288.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Lucas, L.M., Moreno-Ventas, X., Mira, J.R., Medina-López, A., Arijo, S., Moriño, M.A., 2011. *Shewanella putrefaciens* Pdp11 promotes welfare and confers resistance against pathogens on *Solea senegalensis* juveniles cultured at low and high densities. *Abst. V Internat. Work. Faro (Portugal)*, 24.
- García de la Banda, I., Lobo, C., Chabrilón, M., León-Rubio, J.M., Arijo, S., Pazos, G., Lucas, L.M., Moriño, M.A., 2012. Influence of dietary administration of a probiotic on Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) on growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *Aquac. Res.* 43 (5), 662–669.
- García-Carreño, F.L., Dimes, L.E., Haard, N.F., 1993. Substrate-gel electrophoresis for composition and molecular weight of proteinases or proteinaceous proteinase inhibitors. *Anal. Biochem.* 214, 65–69.
- Gills, H.S., 2003. Probiotics to enhance anti-infective defences in the gastrointestinal tract. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* 17 (5), 755–773.
- Gisbert, E., Giménez, G., Fernández, I., Kotzamanis, Y., Estévez, A., 2009. Development of digestive enzymes in common dentex *Dentex dentex* during early ontogeny. *Aquaculture* 287 (3), 381–387.
- Gray, J.P., Herwig, R.P., 1996. Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 4049–4059.
- Heath, P.L., Moore, C.G., 1997. Rearing Dover sole larvae on Tisbe and Artemia diets. *Aquac. Int.* 5, 29–39.
- Henning, S.J., 1987. Functional development of the gastrointestinal tract. In: Johnson, L.R. (Ed.), *Physiology of the gastrointestinal tract*. Raven Press, New York (USA), pp. 285–300.
- Hernández-Martínez, M., Castro-Barrera, T., Garduño-Dionate, M., Castro-Mejía, G., Baltierra-Rodríguez, J.L., 2009. Efecto del alimento vivo enriquecido con *Lactobacillus casei* en la sobrevivencia y crecimiento de larvas y juveniles de *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinopsidae). *Ciencia Pesquera* 17 (2), 5–12.
- Hicks, R.E., Amann, R.J., Stahl, D.A., 1992. Dual staining of natural bacterioplankton with 4', 6-diamidino 2-2 phenylindole and fluorescence oligonucleotide probes targeting kingdom — level 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 58, 2158–2163.
- Imsland, A.K., Foss, A., Conceicao, L.E.C., Dinis, M.T., Delbare, D., Schram, E., Kamstra, A., Rema, P., White, P., 2003. A review of the culture potential of *Solea solea* and *S. senegalensis*. *Rev. Fish Biol. Fish.* 13, 379–408.
- Kane, M.D., Poluslin, M.K., Stahl, D.A., 1993. Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 682–686.
- Kim, D.-H., Austin, B., 2006. Innate immune responses in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*, Walbaum) induced by probiotics. *Fish Shellfish Immunol.* 21, 513–524.
- Kostantinov, S.R., Zhu, W.-Y., Williams, B.A., Tamminga, S., de Vos, W.M., Akkermans, A.D.L., 2003. Effect of fermentable carbohydrates on piglet faecal bacterial communities as revealed by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of 16S ribosomal DNA. *FEMS Microbiol. Ecol.* 43, 225–235.

- Laemmli, U.K., 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lauzon, H.I., Magnadóttir, B., Gudmundsdóttir, B.K., Steinarsson, A., Arnason, I.O., Gudmundsdóttir, S., 2010. Application of prospective probiotics at early stages of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) rearing. *Aquac. Res.* 41 (10), 576–586.
- Lee, S.M., Cho, S.H., Kim, D.J., 2000. Effects of feeding frequency and dietary energy level on growth and body composition of juvenile flounder, *Paralichthys olivaceus* (Temminck & Schlegel). *Aquac. Res.* 31, 917–921.
- Li, X., Jiang, Y., Liu, W., Ge, X., 2012. Protein sparing effect of dietary lipid in practical diets for blunt snout bream (*Megalobrama amblycephala*) fingerlings: effects on digestive and metabolic responses. *Fish Physiol. Biochem.* 38 (2), 529–541.
- Lobo, C., Moreno-Ventas, X., Tapia-Paniagua, S.T., Rodríguez, C., Moriño, M.A., García de la Banda, I., 2014. Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. *Fish Physiology and Biochemistry* 40 (1), 295–309.
- Lund, I., Steenfeldt, S.J., Hansen, B.W., 2007. Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). *Aquaculture* 273, 532–544.
- Makridis, P., Martins, S., Vercauteren, T., Van Driessche, K., Decamp, O., Dinis, M.T., 2005. Evaluation of candidate probiotic strains for gilthead sea bream larvae (*Sparus aurata*) using an *in vivo* approach. *Lett. Appl. Microbiol.* 40, 274–277.
- Mandiki, S.N.M., Milla, S., Wang, N., Blanchard, G., Djonkack, T., Tanascaux, S., Kestemont, P., 2011. Effects of probiotic bacteria on growth parameters and immune defence in Eurasian perch *Perca fluviatilis* L. larvae under intensive culture conditions. *Aquac. Res.* 42, 693–703.
- Marau, S., Louvard, D., Baratti, J., 1973. The aminopeptidase from hog-intestinal brush border. *Biochim. Biophys. Acta* 321, 282–295.
- Martínez, G., Shaw, E.M., Carrillo, M., Zanuy, S., 1998. Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. *Biotechniques* 24, 138–139.
- Morais, S., Caballero, M.J., Conceicao, L.E.C., Izquierdo, M.S., Dinis, M.T., 2006. Dietary neutral lipid level and source in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae: effect on growth, lipid metabolism and digestive capacity. *Comp. Biochem. Physiol. B: Biochem. Mol. Biol.* 144 (1), 57–69.
- Muyzer, G., Waal, E.C.D., Uitterlinden, A.G., 1993. Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction-amplified genes coding for 16S rRNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 695–700.
- Naess, T., Lie, O., 1998. A sensitive method during first feeding for the determination of pigmentation pattern in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus* L. juveniles: the role of diet. *Aquac. Res.* 29 (12), 925–934.
- National Research Council (NRC), 1993. Nutrient Requirements of Fish. National Academy Press, Washington, DC (USA) (114 pp.).
- Nayak, S.K., 2010. Role of gastrointestinal microbiota in fish. *Aquac. Res.* 41, 1553–1573.
- Olafsen, J.A., 2001. Interactions between fish larvae and bacteria in marine aquaculture. *Aquaculture* 200 (1–2), 223–247.
- Padrós, F., Villalta, M., Gisbert, E., Estévez, A., 2011. Morphological and histological study of larval development of the Senegal sole *Solea senegalensis*: an integrative study. *Journal of Fish Biology* 79 (1), 3–32.
- Parra, G., Yúfera, M., 1999. Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup). *Aquac. Res.* 30, 857–863.
- Picchiatti, S., Mazzini, M., Taddei, A.R., Renna, R., Fausto, A.M., Mulero, V., Carnevali, O., Cresci, A., Abelli, L., 2007. Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. *Fish Shellfish Immunol.* 22 (1–2), 57–67.
- Rema, P., Conceicao, L.E.C., Evers, F., Castro-Cunha, M., Dinis, M.T., Dias, J., 2008. Optimal dietary protein levels in juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquac. Nutr.* 14 (3), 263–269.
- Ribeiro, L., Sarasquete, C., Dinis, M.T., 1999. Histological and histochemical development of the digestive system of *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) larvae. *Aquaculture* 171 (3–4), 293–308.
- Ribeiro, L., Engrola, S., Dinis, M.T., 2005. Weaning of Senegalese sole (*Solea senegalensis*) postlarvae to an inert diet with a co-feeding regime. *Cienc. Mar.* 31, 327–337.
- Ringo, E., 1999. Does *Carnobacterium divergens* isolated from Atlantic salmon, *Salmo salar* L., colonize the gut of early developing turbot, *Scophthalmus maximus* L., larvae? *Aquac. Res.* 30 (3), 229–232.
- Ringo, E., Jutfelt, F., Kanapathipillai, P., Bakken, Y., Sundell, K., Glette, J., Mayhew, T.M., Myklebust, R., Olsen, R.E., 2004. Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res.* 318, 305–311.
- Robertson, P.A.W., Dowd, C.O., Burrells, C., Williams, P., Austin, B., 2000. Use of *Carnobacterium* sp. as a probiotic for Atlantic Salmon (*Salmo salar* L.) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Walbaum). *Aquaculture* 18, 235–243.
- Rodríguez, C., Lorenzo, A., Martín, V., 2009. Nutrición lipídica. In: OESA, CSIC, MARM (Eds.), “La nutrición y la alimentación en piscicultura”. Madrid, (España), pp. 153–274.
- Rønnestad, I., Conceicao, L.E.C., 2005. In: Starck, J.M., Wang, T. (Eds.), Aspects of Protein and Amino Acid Digestion and Utilization by Marine Fish Larvae. Science Publishers, Enfield, New Hampshire, pp. 389–416.
- Sáenz de Rodríguez, M.A., Díaz-Rosales, P., Chabrillón, M., Smidt, H., Arijo, S., Rubio, J.M.L., Alarcón, F.J., Balebona, M.C., Moriño, M.A., Cara, J.B., Moyano, F.J., 2009. Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquac. Nutr.* 15, 177–185.
- Salas-Leiton, E., Anguis, V., Rodríguez-Rúa, A., Cañavate, J.P., 2010. Stocking homogeneous size groups does not improve growth performance of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) juveniles: individual growth related to fish size. *Aquac. Eng.* 43 (3), 108–113.
- Salinas, I., Díaz-Rosales, P., Cuesta, A., Meseguer, J., Chabrillón, M., Moriño, M.A., Esteban, M.A., 2006. Effect of heat-inactivated fish and non-fish derived probiotics on the innate immune parameters of a teleost fish (*Sparus aurata* L.). *Vet. Immunol.* 111, 279–286.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Sánchez, P., Ambrosio, P.P., Flos, R., 2010. Stocking density and sex influence individual growth of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 300 (1–4), 93–101.
- Sanguinetti, C.J., Neto, E.D., Simpson, A.J., 1994. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *Biotech* 17, 914–921.
- Sansonetti, P.J., 2004. War and peace at mucosal surfaces. *Nat. Rev. Immunol.* 4 (12), 953–964.
- Sargent, J.R., Tocher, D.R., Bell, J.G., 2002. The lipids. In: Halver, J.E., Hardy, R.W. (Eds.), Fish Nutrition, 3rd ed. Academic Press, New York, New York, USA, pp. 181–257.
- Sekirov, I., Finlay, B.B., 2009. The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J. Physiol.* 587, 4159–4167.
- Sokal, R., Rohlf, J., 1981. Biometry, Second edition. WH Freeman and Company, New York (USA).
- Stotttrup, J.G., McEvoy, L.A., 2003. Live Feeds in Marine Aquaculture. Blackwell Science, Oxford, UK.
- Sugita, H., Okano, R., Suzuki, Y., Iwai, D., Mizukami, M., Akiyama, N., Matsuura, S., 2002. Antibacterial abilities of intestinal bacteria from larval and juvenile Japanese flounder against fish pathogens. *Fish. Sci.* 68 (5), 1004–1011.
- Sun, Y.Z., Yang, H.L., Juang, K.P., Ye, J.D., Chun-Xiao, Z., 2013. Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Aquaculture* 392–395, 44–50.
- Suzer, C., Coban, D., Kamaci, H.O., Saka, S., Firat, K., Otcuoglu, O., Kucukcari, H., 2008. *Lactobacillus* spp. bacteria as probiotics in gilthead sea bream (*Sparus aurata*, L.) larvae: effects on growth performance and digestive enzyme activities. *Aquaculture* 280, 140–145.
- Taoka, Y., Maeda, H., Jo, J.Y., Jeon, M.J., Bai, S.C., Lee, W.J., Yuge, K., Koshio, S., 2006. Growth, stress tolerance and non-specific immune response of Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* to probiotics in a closed recirculating system. *Fish. Sci.* 72 (2), 310–321.
- Tapia-Paniagua, S., Chabrillón, M., Díaz-Rosales, P., García de la Banda, I., Lobo, C., Balebona, M.C., Moriño, M.A., 2010. Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *FEMS Microbiol. Ecol.* 60, 310–319.
- Tapia-Paniagua, S.T., Díaz-Rosales, P., León-Rubio, J.M., García de la Banda, I., Lobo, C., Alarcón, F.J., Chabrillón, M., Rosas-Ledesma, P., Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Mancera, J.M., 2012. Use of the probiotic *S. putrefaciens* Pdp11 on the culture of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) and gilthead seabream (*Sparus aurata*, L.). *Aquac. Int.* 20 (6), 1025–1039.
- Tinh, N.T.N., Dierckens, K., Sorgeloos, P., Bossier, P., 2008. A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar. Biotechnol.* 10, 1–12.
- Vadstein, O., 1997. The use of immunostimulation in marine larviculture: possibilities and challenges. *Aquaculture* 155, 401–417.
- Varela, J.L., Ruiz-Jarabo, I., Vargas-Chacoff, L., Arijo, S., León-Rubio, J.M., García-Millán, I., Martín del Río, M.P., Moriño, M.A., Mancera, J.M., 2010. Dietary administration of probiotic Pdp11 promotes growth and improves stress tolerance to high stocking density in gilthead seabream *Sparus auratus*. *Aquaculture* 309, 265–271.
- Verschuer, L., Rombout, G., Huys, G., Dhont, J., Sorgeloos, P., Verstraete, W., 1999. Microbial control of the cultura of *Artemia* juveniles through preemptive colonization by selected bacterial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 65 (6), 2527–2533.
- Virgin, H.W.S., 2007. In vivo veritas: pathogenesis of infection as it actually happens. *Nat. Immunol.* 8 (11), 1143–1147.
- Villamil, L., Figueras, A., Planas, M., Novoa, B., 2003. Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219 (1–4), 43–56.
- Wu, X.Z., Feng, X., Xie, L.L., Peng, X.Y., Yuan, J., Chen, X.X., 2012. Effect of probiotic *Bacillus subtilis* Ch9 for grass carp, *Ctenopharyngodon idella* (Valenciennes, 1844), on growth performance, digestive enzyme activities and intestinal microflora. *J. Appl. Ichthyol.* 28, 721–727.
- Yang, H.L., Sun, Y.Z., Ma, R.L., Ye, J.D., 2012. PCR-DGGE analysis of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus clausii* administration. *Aquac. Res.* 43 (4), 489–497.
- Zarza, C., Padrós, F., 2008. An overview of diseases of farmed sole. *Abstr. IV Internat. Sole Work. Faro, Portugal*, p. 15.

Probiotic Supplementation Influences the Diversity of the Intestinal Microbiota During Early Stages of Farmed Senegalese Sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858)

Silvana Tapia-Paniagua · Carmen Lobo ·
 Xabier Moreno-Ventas · Inés García de la Banda ·
 Miguel A. Moriñigo · M. Carmen Balebona

Received: 10 March 2014 / Accepted: 6 July 2014 / Published online: 8 August 2014
 © Springer Science+Business Media New York 2014

Abstract Ingestion of bacteria at early stages results in establishment of a primary intestinal microbiota which likely undergoes several stages along fish life. The role of this intestinal microbiota regulating body functions is crucial for larval development. Probiotics have been proved to modulate this microbiota and exert antagonistic effects against fish pathogens. In the present study, we aimed to determine bacterial diversity along different developmental stages of farmed Senegalese sole (*Solea senegalensis*) after feeding probiotic (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) supplemented diet for a short period (10–30 days after hatching, DAH). Intestinal lumen contents of sole larvae fed control and probiotic diets were collected at 23, 56, 87, and 119 DAH and DNA was amplified using 16S rDNA bacterial domain-specific primers. Amplicons obtained were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), cloned, and resulting sequences compared to sequences in GenBank. Results suggest that *Shewanella putrefaciens* Pdp11 induces a modulation of the dominant bacterial taxa of the intestinal microbiota from 23 DAH. DGGE patterns of larvae fed the probiotic diet showed a core of bands related to *Lactobacillus helveticus*, *Pseudomonas acephalitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, and

Shewanella genus, together with increased *Vibrio* genus presence. In addition, decreased number of clones related to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* at 23 and 56 DAH was observed in probiotic-fed larvae. A band corresponding to *Shewanella putrefaciens* Pdp11 was sequenced as predominant from 23 to 119 DAH samples, confirming the colonization by the probiotics. Microbiota modulation obtained via probiotics addition emerges as an effective tool to improve *Solea senegalensis* larviculture.

Keywords *Solea senegalensis* · Probiotics · Larviculture · Intestinal microbiota

Introduction

Aquaculture has been the fastest growing food production sector in the world over the last 30 years. During this time, farmers have been mainly focused in easily produced remunerative species. Despite recent significant advances on weaning techniques and larvae feeding (Conceicao et al. 2007; Engrola et al. 2009), the production of high-quality sole juveniles is still a bottleneck (Damaso-Rodrigues et al. 2010). Fish larvae are exposed to microbiota-associated disorders because they start feeding when the digestive tract is not fully developed (Rodríguez et al. 2009). The fish intestinal tract is an ecosystem containing microbial assemblages involved in very important functions such as the integrity of the epithelial surface, stimulation of the epithelial proliferation, and nutrition and digestion via the production of a range of vitamins and enzymes (Ramirez and Dixon 2003; Ringø et al. 2004, 2007). The intestinal microbiota also plays a crucial role on the host immunity through the immunostimulation and development of gut-associated lymphoid tissues (Picchiatti et al. 2007; Rombout et al. 2011), with important functions in the

Silvana Tapia-Paniagua and Carmen Lobo contributed equally to this work.

S. Tapia-Paniagua · M. A. Moriñigo · M. C. Balebona (✉)
 Departamento de Microbiología, Universidad de Málaga, Campus de
 Teatinos s/n, 29071 Málaga, Spain
 e-mail: balebona@uma.es

C. Lobo · I. G. de la Banda
 Centro Oceanográfico de Santander, Instituto Español de
 Oceanografía, 39080 Santander, Spain

X. Moreno-Ventas
 Departamento de Ciencias y Técnicas del Agua y del Medio
 Ambiente, Universidad de Cantabria, 39005 Santander, Spain

 Springer

outbreak of diseases. As the gastrointestinal tract serves as a route for entry of pathogenic microorganisms (Chen et al. 2008; Ringø et al. 2004), disruptions of its ecologic balance, increased permeability, and deficiencies in immune defences may lead to bacterial translocation of pathogenic microorganisms (Ringø et al. 2007; Sekirov and Finley 2009).

In this context, the application of probiotics to fish larviculture has been extensively established based on health parameters and growth performance (Avella et al. 2010; Carnevali et al. 2006; Gatesoupe 2008; Tinh et al. 2008), although the modes of action involved are largely unknown (Merrifield et al. 2010; Askarian et al. 2011, 2012). Microbial modulation of the autochthonous intestinal microbiota may be considered as one of these modes of action (Ferguson et al. 2010; Merrifield et al. 2010).

Shewanella putrefaciens Pdp11 has been proposed as a species exhibiting remarkable probiotic characteristics, including antagonism against some of the most important pathogens for Senegalese sole *Solea senegalensis* (Chabrilón et al. 2005a, b) and increasing fish resistance against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* (Díaz-Rosales et al. 2009; García de la Banda et al. 2010, 2012). Moreover, *Shewanella putrefaciens* Pdp11 was reported to protect intestinal epithelium integrity of sole juveniles (García de la Banda et al. 2010; Sáenz de Rodríguez et al. 2009), enhancing growth and biochemical composition both at on-growing (García de la Banda et al. 2012) and larval rearing (Lobo et al. 2014). However, a general understanding of the microbiota associated with *Solea senegalensis* in the first stages of development is necessary to improve rearing performances and adequate use of probiotics.

In this study, we describe the variability and succession of the predominant bacterial taxa of the intestinal microbiota in the first stages of *Solea senegalensis* development. In addition, administration of a short probiotic pulse during metamorphosis (10–30 days after hatching (DAH)) was conducted to evaluate effects on intestinal microbiota of farmed sole larvae and fry.

Material and Methods

Microorganisms

Shewanella putrefaciens Pdp11 cells were stored at -80°C in tryptone soya broth (Oxoid Ltd., Basingstoke, UK) supplemented with 15 g l^{-1} NaCl (TSBs) and 15 % glycerol for long-term storage. For the experiments, bacterial strains were grown in tubes containing 5 ml (TSBs) for 18 h at 22°C , with continuous shaking. Appropriate dilutions of the cultures were spread onto tryptone soya agar (DifcoTM, Sparks, USA) plates supplemented with 1.5 % NaCl (TSAs) and confirmed as Pdp11 according to Díaz-Rosales et al. (2009). Aliquots of

0.1 ml of the culture were spread onto TSAs plates and incubated for 24 h at 22°C . Bacterial suspensions were prepared by scraping cells from the plates and washing them in sterile phosphate-buffered saline (PBS, pH 7.4), and finally added to *Artemia* ($200\text{--}300\text{ metanauplii ml}^{-1}$) at least 3 h prior to larval feeding at $2.5 \times 10^7\text{ CFU ml}^{-1}$ (final concentration). Bacterial concentration was determined by count on TSAs plates. The bacterial dose has been previously reported as suitable by Lobo et al. (2014) and is in the range of other probiotics used in larviculture (Dias et al. 2011; Hernández-Martínez et al. 2009). No probiotic cells were supplied to the *Artemia* incubator used as control. After an incubation period of 3–9 h, the concentration of total bacteria was $10^4\text{ CFU Artemia metanauplii}^{-1}$ where *Shewanella putrefaciens* Pdp11 cells accounted at least for 50 %. These values are similar to those reported by other authors (Villamil et al. 2003a; Carnevali et al. 2004). No mortalities of *Artemia metanauplii* were registered during the incubation period. *Artemia* from both incubators (45 l) were maintained at 23°C and rinsed with $1\text{ }\mu\text{m}$ filtered seawater for 5 min prior to their supply to rearing tanks.

Rearing Conditions

Embryos were obtained from natural spawning of captive *Solea senegalensis* broodstock kept at the Spanish Institute of Oceanography (Santander, Spain). Embryos were incubated at $19.0 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$ in 7 l cylinder-conical incubating tanks with gentle aeration and 0.5 l min^{-1} continuous seawater flow. Newly hatched larvae ($40\text{ individuals l}^{-1}$) were distributed into 250 l circular polyester tanks, with constant aeration and seawater renewal. Temperature was $18.6 \pm 1.1^{\circ}\text{C}$ and salinity was 35.4 g l^{-1} throughout the trial. Illumination ($1,000\text{ lx}$ on surface water) was continuous until 10 DAH and a 12:12 L/D cycle was established until 21 DAH, whereas 0:24 L/D was used thereafter. Continuous water inflow was maintained to provide suitable oxygen and nitrite seawater levels for larval and postlarval culture (Lund et al. 2007; Parra and Yúfera 1999).

Feeding regime was based on Cañavate and Fernández-Díaz (1999). *Isochrysis galbana*-enriched rotifers were added to the tanks twice a day, from 3 to 9 DAH, to maintain a rotifer density of $20\text{ individuals ml}^{-1}$. Microalgae (*Nannochloropsis gaditana*, $3 \times 10^5\text{ cells ml}^{-1}$ and *I. galbana*, $7 \times 10^4\text{ cells ml}^{-1}$) were also supplied during this period to ensure good rotifer quality. Co-feeding regimen consisting in *Artemia* and commercial pellet Gemma Micro Diamond (57 % crude protein and 15 % total lipids, Skretting, Burgos, Spain) was applied from 10 to 57 DAH. *Artemia metanauplii* (EG strain INVE Aquaculture, Ghent, Belgium) were previously enriched with Origreen (43 % fresh protein and 30 % total lipids, Skretting, Burgos, Spain) for 18 h, and then supplied to the tanks four times a day, whereas dry feed was supplied eight times a day.

Weaning started at 58 DAH (Gemma Wean Diamond, crude protein 60 % and total lipids 15 %, Skretting, Burgos, Spain). Larvae were fed exclusively dry feed (Gemma Diamond) from 87 DAH. The amount of inert feed was gradually increased from 58 DAH (39 g m⁻², 69.2 % total feed) to 87 DAH (117 g m⁻²), while *Artemia* doses were progressively reduced from 14 metanauplii mL⁻¹. At the end of the trial, sole fries were fed 11.3 % total tank biomass. Two live feeding regimes were compared: Pdp11 and Control. Pdp11 group consisted of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 bacterial strain bioencapsulated in Origreen-enriched *Artemia*. The treatment was given three times a day (from 10 to 30 DAH), whereas no bacteria were administered to the control group. From 30 DAH and until the end of weaning, all larvae were fed non-supplemented *Artemia*. Each dietary treatment was evaluated by triplicate.

Digestive Microbiota Analysis

Six larvae from each batch were collected on days 23 (end of metamorphosis), 56 (beginning of weaning), 87 (end of weaning), and 119 DAH and digestive microbiota was studied. The whole intestines were aseptically removed and stored at -20 °C until further analysis. The intestinal contents were homogenized in 1 ml PBS (pH 7.2), and 1 ml aliquot was centrifuged at 1,000×g for 5 min. Total DNA was extracted from samples according to Martínez et al. (1998), with some modifications as described by Tapia-Paniagua et al. (2010). Agarose gel (1.5 % [wt/vol]) electrophoresis in the presence of ethidium bromide was used to visually check for DNA quality and yield. DNA from an axenic culture of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 in TSBs was used as positive control for the presence of the probiotics in intestinal samples.

PCR Denaturing Gradient Gel Electrophoresis Analysis

DNA was amplified using the 16S rDNA bacterial domain-specific primers 968-GC-F (5'GAACGCGAAGAACCTT AC-3') and 1401-R (5'CGGTGTGTACAAGACCC-3'). Primer 968-GC-F carries a 35-bp GC clamp. Both primers amplify V6-V8 regions of 16S rDNA and yield 470-bp length amplicons. PCR mixtures and conditions to perform PCR were those previously described by Tapia-Paniagua et al. (2010). The amplicons obtained were separated by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE) according to Muyzer et al. (1993) specifications using a Dcode TM system (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA). The gels were subsequently stained with AgNO₃ (Sanguinetti et al. 1994). A DGGE analysis of all samples was performed twice.

Structural diversity of the microbial community was determined based on the DGGE patterns, which were analyzed using FPQuest Software version 4.0 (Applied Maths BVBA, Sint-Martens-Latem, Belgium). A matrix of similarities using

Bray–Curtis index was calculated for densitometric curves and a similarity matrix was obtained. Clustering of DGGE patterns was achieved by construction of dendrograms using the Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Averages (UPGMA). In order to be able to compare intestinal microbial communities, several parameters were evaluated: (1) species richness (*R*), based on the total number of bands; (2) Shannon diversity index (*H'*), according to the function: $H' = -\sum P_i \log P_i$, where *P_i* is defined as (*n_i*/*N*), *n_i* is the peak surface of each band, and *N* is the sum of the peak surfaces of all bands; and (3) range-weighted richness (*R_r*) (Marzorati et al. 2008), calculated as the total number of bands multiplied by the percentage of denaturing gradient needed to describe the total diversity of the sample analyzed, following the formula: $R_r = (N^2 \times D_g)$, where *N* represents the total number of bands in the pattern, and *D_g* the denaturing gradient comprised between the first and the last band of the pattern.

Cloning of PCR-Amplified Products

DNA extracted from larvae sampled at each stage was pooled before performing the cloning process. Bacterial 16S rDNA was amplified by PCR using forward primer S-D-Bact-0008-aS-20 (5' AGA GTT TGA TCC TGG CTC AG 3') (Hicks et al. 1992) and reverse primer S*-Univ-1492-b-A-21 (59ACG GCT ACC TTG TTA CGA CTT 3') (Kane et al. 1993), with Taq DNA polymerase kit from Life Technologies (Gaithersburg, MD, USA), 20 mM Tris-HCl (pH 8.5), 50 mM KCl, and 3 mM MgCl₂. Amplification was carried out as described by Gray and Herwig (1996). Reactions were performed in tubes containing 100 ng total DNA, 1.25 U Taq DNA polymerase, 2.5 mM MgCl₂ buffer, 200 mM each deoxyribonucleotide triphosphate, and 10 μM each primer in 50 μl final volume. Initial DNA denaturation and enzyme activation steps were performed at 94 °C for 10 min in an Eppendorf thermocycler, followed by 30 cycles denaturation at 92 °C for 1 min, annealing at 48 °C for 1 min, and elongation at 72 °C for 1 min 30 s, and final elongation at 72 °C for 5 min. PCR products were purified and concentrated with High Pure Spin Kit PCR purification kit (Roche) according to manufacturer instructions. Purified PCR products were cloned into pGEM-T vector (Promega, Madison, WI, USA). Ligation was performed overnight at 4 °C followed by transformation into competent *Escherichia coli* JM109. One hundred ampicillin-resistant transformant colonies from each diet and time sampled were transferred with a sterile toothpick to 100 μl TE buffer and boiled for 10 min at 95 °C. Then, PCR was performed with pGEMT-specific primers T7 (5'-AAT ACG ACT CAC TAT AGG-3') and SP6 (5'-ATT TAG GTG ACA CTA TAG-3'). Plasmids containing an insert were used to amplify 16S rDNA V6-V8 region. Amplicons were compared with the bands of DGGE patterns and used for sequence analysis (Macrogen Korea sequencing).

Statistical Analysis

Bray–Curtis similarity index was calculated based on DGGE densitometric curves and used for cluster analysis (UPGMA method) and non-metric multidimensional (NMDS) plots. Analysis of similarities (ANOSIM) to test for significant differences between control and treatment groups was carried out using PAST software. Contribution of operational taxonomic units (OTUs) identified from cloning experiments to similarity percentages (SIMPER) between control and treatment groups was determined by using PAST software. Significance of differences in Shannon index, species richness, and range-weighted richness (Rr) was determined after performing analysis of variance (ANOVA) with XLSTAT 2013 software (Addinsoft, Spain).

Results

Intestinal bacterial communities from six individuals per treatment and development stage have been analyzed using PCR-DGGE to obtain an overview of bacterial diversity, and 16S rDNA clone libraries have been performed to reveal higher resolution of microbiota composition in both control and probiotic-treated larvae.

Cluster analysis was carried out using UPGMA methods based on Bray–Curtis similarity of densitometric 16S rDNA PCR-DGGE curves. Band patterns from 23 DAH (end of metamorphosis) larval samples resulted in two clusters grouping animals fed probiotic and control diet (54 % similarity) (Fig. 1a). Each cluster consisted of five out of six individuals of each treatment; however, no statistically significant differences ($p < 0.005$) were visualized when NMDS analysis and ANOSIM were performed comparing intestinal bacterial communities of probiotic and control samples (Fig. 2).

On the contrary, 56 DAH (start of weaning) and 87 DAH (end of weaning) larval PCR-DGGE patterns clustered in two separated major groups: one including control larvae (80 % similarity) and the other comprising *Shewanella putrefaciens* Pdp11-fed larvae (84 and 88 % similarity, respectively) (Fig. 1b, c). These two clusters were not observed in 119 DAH animals, when intra-treatment similarity decreased and *Shewanella putrefaciens* Pdp11 and control specimens grouped together again (Fig. 1d). In this case, significant differences ($p < 0.005$) were visualized by the NMDS plot and confirmed using ANOSIM for 56 and 87 DAH samples while populations of probiotic and control groups overlapped in 119 DAH samples (Fig. 2).

Average numbers of OTUs or species richness as determined by DGGE bands ranged from 23.0 ± 5.0 to 31.3 ± 3.0 bands in all intestinal samples. No significant differences were observed in species richness regarding the feeding treatment

(Table 1). However, significantly lower diversity expressed as Shannon index was observed in the intestines from 56 DAH (2.1 ± 0.2) and 87 DAH (2.1 ± 0.1) larvae fed the probiotic diet compared to their control groups (2.6 ± 0.1 and 2.6 ± 0.2 , respectively) (Table 1). In addition, range-weighted richness (Rr) was used to study the carrying capacity of the environment based on the number of PCR-DGGE bands and the percentage of denaturing gradient in the DGGE gel needed to describe the total diversity of the sample analyzed. Rr was statistically higher in 56 and 87 DAH larvae compared to their control groups, indicating higher probability in these intestinal environments to host higher genetic variability (Table 1).

The intensity of a band provides a rough estimate of the proportion of the sequence in a sample, but this may not correlate with cellular relative abundance within the intestine. In order to identify the species corresponding to predominant bands in the DGGE gels, clone libraries of 16S rDNA sequences were prepared from PCR products loaded in DGGE gels. A total of 100 clones per treatment and batch were obtained and sequenced. Mobility of 16S rDNA cloned fragments was compared to the mobility in the original profiles by DGGE and DNA sequences of clones corresponding to dominant bands or unique clones determined. DNA sequences of clones were identified at species level (>95 % similarity to nearest type strain) and at genus level (at least 90 % similarity to nearest type strain) (Table 2).

The total number of operational units (OTUs) was determined based on the number of recombinants obtained with PCR products from pooled intestinal samples for each treatment and fish age. The most frequently OTUs detected in the intestinal microbiota of *Solea senegalensis* larvae along the stages studied were identified as γ -*Proteobacteria* (percentages ranging from 55 to 68 % total clones) regardless the diet administered (Fig. 3). OTUs belonging to the phyla *Firmicutes* (12–22 % total clones), *Actinobacteria* (1–13 % total clones), *Mollicutes* (1–9 % total clones), and unidentified bacteria (5 to 21 % total clones) were also detected (Fig. 3).

Sequencing of clones obtained from control diet larvae showed a core of bacteria maintained along the stages sampled. These bands corresponded to OTUs identified as *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Alliivibrio*, *Vibrio*, *Rhodococcus*, *Mycoplasma*, *Anoxybacillus*, *Geobacillus* genus and *Brevibacillus parabravis*, *Vibrio campbelli*, and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* species (Fig. 4). Closest relatives as determined by comparative 16S rDNA sequence analysis are summarized in Table 2.

Intestinal microbiota of larvae fed control and probiotic diets shared a total of 10 OTUs comprised by *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Acinetobacter*, and *Brevibacillus* genera and *Vibrio campbelli* (Fig. 4). Nevertheless, a core of six OTUs was uniquely present in *Shewanella putrefaciens* Pdp11 larvae (Fig. 4). These OTUs were identified as

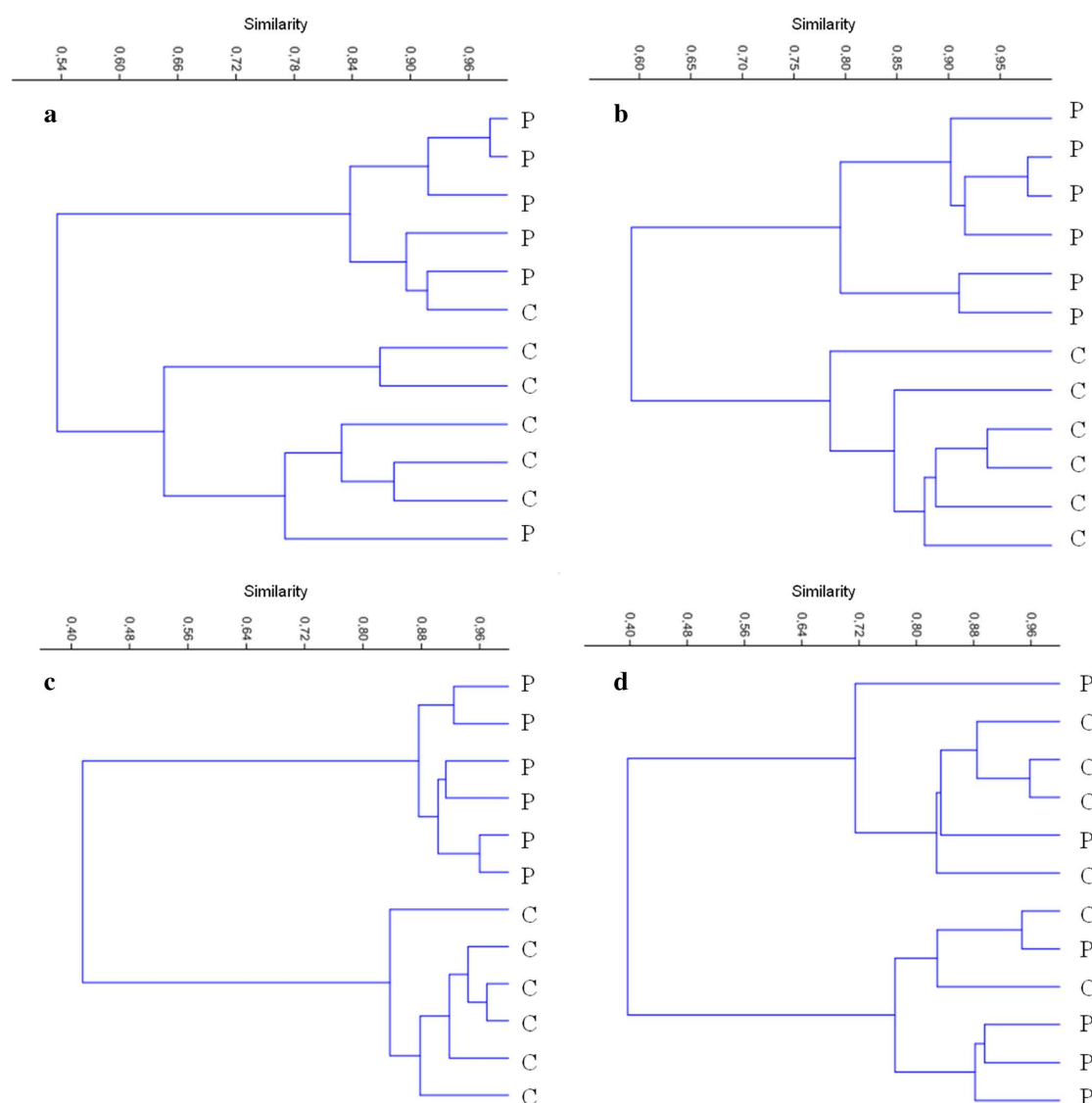


Fig. 1 Cluster analysis was carried out using UPGMA methods based on Bray–Curtis similarity of densitometric 16S rDNA PCR-DGGE curves

Lactobacillus helveticus, *Pseudomonas acephalitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, and *Shewanella* genus. Increased presence of *Vibrio* species was detected in larvae receiving the probiotics. It is worth highlighting that OTUs corresponding to *Photobacterium damsela* subsp *piscicida* were not detected in *Shewanella putrefaciens* Pdp11-fed fish, whereas *Shewanella* genus and *Lactobacillus helveticus* were present, representing 10 and 5 % of the clones. Conversely, no OTUs were identified as *Shewanella* in microbiota from control larvae, while *Photobacterium* comprised between 8 and 1 % of the clones (23 to 119 DAH).

In order to break down the contribution of each bacterial group to the observed dissimilarity between *Shewanella putrefaciens* Pdp11 and control samples, similarity percentage analysis (SIMPER) was carried out. In this way, most important species in creating the observed pattern of dissimilarity attributed to probiotic diet at each age were identified. Bacterial groups and contribution to dissimilarity between treated and control groups resulting from SIMPER analysis is summarized in Table 3. Differences in bacterial communities at 56 DAH (start weaning) were attributed to *Shewanella* (17.24 %), unidentified bacteria (17.24 %), *Acinetobacter*

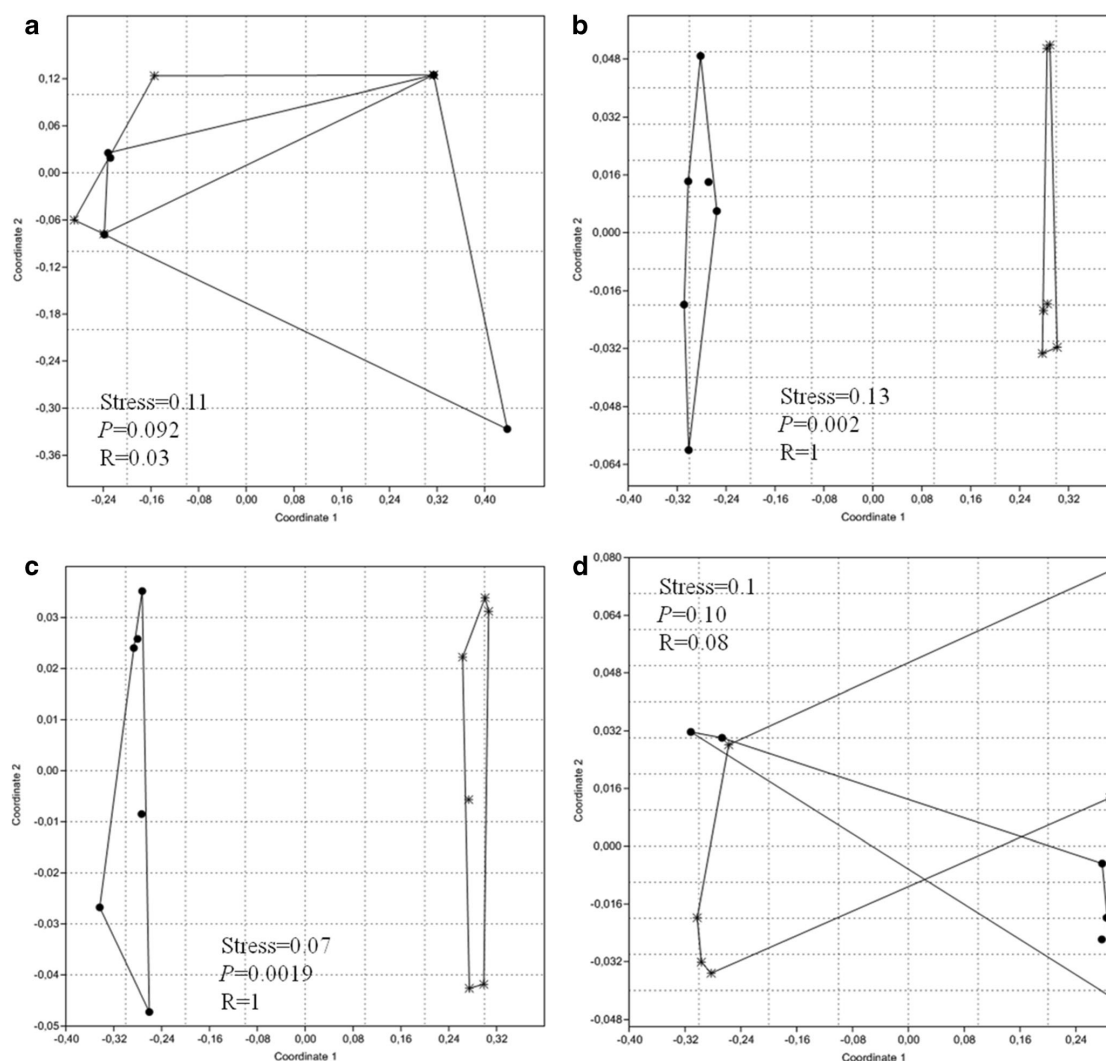


Fig. 2 NMDS analysis and ANOSIM were performed comparing intestinal bacterial communities of probiotic and control samples

(10.34 %), *Rhodococcus* (8.62 %), and *Lactobacillus* (8.62 %), jointly contributing to 62.06 % total dissimilarity compared to control-fed fish. In the case of 87 DAH, sole differences were attributed to *Vibrio* (18.18 %), *Shewanella* (13.64 %), *Candidatus* Arthromitus (13.64 %), and *Acinetobacter* (12.12 %). *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* contributed to 11.11 % dissimilarity in 23 DAH control larvae. Presence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* was also detected in samples from control larvae at subsequent developmental stages. At the same time, more than 20 % differences were due to *Shewanella putrefaciens* Pdp11 presence in probiotic-fed larvae. This data may be

consequence of antagonistic effects exerted by the probiotics on *Photobacterium* cells.

Discussion

The introduction of a probiotic to the larval and fry gut may help to avoid the presence of opportunistic and pathogenic bacteria (Hansen and Olafsen 1999; Yang et al. 2012), as well as to develop enhanced immune response (Picchietti et al. 2007; Sun et al. 2013). Dendrograms representing the similarity of the microbial profiles from PCR-DGGE fingerprints

Table 1 Shannon diversity index (H'), species richness (R) and range-weighted richness (Rr) values of intestinal microbiota DGGE patterns of Senegalese sole larvae fed control and probiotic (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) diets and sampled at 23, 56, 87, and 119 days after hatching (DAH). Fish were fed probiotic diet from 10 to 30 DAH. Data expressed as mean \pm standard deviation

DAH	Diet	H'	R	Rr
23	Control	2.6 \pm 0.2	23.0 \pm 5.0	105 \pm 20.50
	Probiotic	2.3 \pm 0.2	24.0 \pm 3.0	115 \pm 10.75
56	Control	2.6 \pm 0.1	31.0 \pm 2.0	115 \pm 9.23
	Probiotic	2.1 \pm 0.2*	31.0 \pm 2.0	192 \pm 10.11*
87	Control	2.6 \pm 0.2	25.0 \pm 3.0	125 \pm 15.25
	Probiotic	2.1 \pm 0.1*	31.3 \pm 3.0	192 \pm 12.20*
119	Control	2.8 \pm 0.1	25.3 \pm 2.0	125 \pm 10.15
	Probiotic	2.5 \pm 0.1	26.0 \pm 2.0	135 \pm 9.70

Significant differences compared to the control group are noted by asterisk

clustered probiotic and control samples from 56 and 87 DAH larvae into significantly different groups. In the case of 23 DAH (just metamorphosed) larval fingerprints, although most of probiotic samples clustered together, intra-group similarity was lower. Transition from live to inert feeding is carried out in Senegalese sole from 56 to 87 DAH. This weaning period is critical and frequently yields reductions in sole post-larvae growth rates (Engrola et al. 2009; Mai et al. 2009). Establishment of adequate intestinal microbiota may have important effects on immune tolerance and successful fish rearing (Sugita et al. 1994). In the present study, modifications in sole intestinal microbiota started to be observed at 23 DAH, although they were not significant until 56 DAH. A transient time seems to be necessary for the establishment of microbial communities characteristic of probiotic-treated fish. Similar results were reported by De Schryver et al. (2010) in seabass (*Dicentrarchus labrax*) fed with poly- β -hydroxybutyrate (PHB) supplemented diets.

In the present study, transition from live to inert diet was carried out from 56 to 87 DAH. It is well known that weaning is a critical period in sole rearing and frequently yields reductions in fish growth rates (Engrola et al. 2009; Mai et al. 2009). Growth performance of *Shewanella putrefaciens* Pdp11-fed specimens was significantly enhanced versus control along weaning (Lobo et al. 2014). Nevertheless, extended growth periods without *Shewanella putrefaciens* Pdp11 supplementation (119 DAH samples), resulted in lower intra-group similarity percentages, indicating that effects of probiotic feeding on larval intestinal microbiota lasted for 2 months but not reached juvenile stage. A period of 60-day feeding has been reported for *Shewanella putrefaciens* Pdp11 microbiota modulation in sole juveniles (Tapia-Paniagua et al. 2010).

Although the DGGE technique may present biases in the detection of bacterial taxa (Woodcock et al. 1997), changes in

band abundances as reflected by bacterial diversity can indicate ecological shifts in the characteristics of bacterial communities (Van der Gast et al. 2006; Woodcock et al. 1997). In this context, Shannon index (H') values showed that bacterial evenness for the dominant taxa detected by DGGE in the intestines of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 larvae at 56 and 87 DAH were statistically lower compared to those obtained for control larvae. On the contrary, Rr values were higher in probiotic larvae, reflecting increasing genetic variability of the intestinal microbiota (De Schryver et al. 2010). Differences observed in H' and Rr indicate a shift in the intestinal microbiota of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 larvae that can be attributed to the modulation exerted by the probiotic strain, as it has been described in sole juveniles by García de la Banda et al. (2010) and Tapia-Paniagua et al. (2010). In this sense, other microorganisms such as *Bacillus licheniformis* (Kumar et al. 2013), *Pediococcus acidilactici* (Ferguson et al. 2010), and *Enterococcus faecium* (Avella et al. 2011) proposed as probiotics in aquaculture have been reported as effective digestive microbiota modulators in prawn *Macrobrachium rosenbergii*, turbot (*Scophthalmus maximus*), and Dover sole (*Solea solea*), respectively.

In this study, the majority of bacterial taxa associated with Senegalese sole larvae and fry were identified as γ -*Proteobacteria* followed by *Firmicutes*. These bacterial groups are frequently reported as predominant ones in farmed fish such as rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) (Navarrete et al. 2010) and yellow seahorse (*Hippocampus kuda*) (Tanu et al. 2012). On the other hand, γ -*Proteobacteria*, but not *Firmicutes*, has also been detected as a predominant group in the intestinal microbiota of weaned *Solea senegalensis* specimens (Martín-Antonio et al. 2007; Tapia-Paniagua et al. 2010).

Likewise, a core of microorganisms including *Acinetobacter*, *Pseudomonas*, *Enterobacter*, *Halomonas*, *Vibrio*, *Allivibrio*, *Rhodococcus*, *Geobacillus* and *Mycoplasma* genera, and *Brevibacillus parabravis* and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* were detected in control larvae along the study. The majority of these microorganisms has not been described in the intestinal microbiota of sole juveniles (Martín-Antonio et al. 2007; Tapia-Paniagua et al. 2010). Intestinal fish microbiota is highly influenced by the aquatic environment. In the case of larvae, Ingerslev et al. (2014) reported increasing microbial abundance and diversity after first-feeding and dominance of phylum γ -*Proteobacteria* in juvenile rainbow trout fed a diet containing fish meal and oil from marine sources. Hoj et al. (2009) found *Artemia* nauplii to be an important source of bacteria that can be transferred to larvae when nauplii are used as live feed. In this context, γ -*Proteobacteria* have also been reported as the most abundant group in nearly hatched *Artemia* nauplii and *Halomonas*, *Vibrio*, and *Pseudomonas* being some of the predominant genera (Høj et al. 2009; Tkavc et al. 2011).

Table 2 Nearest-match identification of 16S rDNA sequences of clone libraries from intestines of soles fed control (C) and *Shewanella putrefaciens* Pdp11 supplemented (P) diets from 10 to 30 days after hatching (DAH). Percentages are relative to the total number of clones obtained for each treatment and fish developmental stage. Fish were sampled at 23, 56, 87, and 119 DAH

Closest relative	Similarity (%)	GenBank accession	Clone percentage							
			23 DAH		56 DAH		87 DAH		119 DAH	
			C	P	C	P	C	P	C	P
<i>γ-Proteobacteria</i>										
<i>Acinetobacter</i> sp MBL 11-0202	98	HM366450	4	5	5	1	5	1	4	0
<i>Acinetobacter</i> sp CmNA3	99	HM352317	4	3	6	4	5	1	2	5
<i>Allivibrio</i> sp SW5-1	97	FR744854	4	0	4	1	4	5	6	5
<i>Enterobacter</i> sp 11H	97	HM803943	8	6	5	4	6	6	5	9
<i>Enterobacter</i> sp CC-SN15-5	99	EU596390	1	4	5	6	1	1	5	3
<i>Halomonas</i> sp AMP12	97	HM104378	8	5	5	1	4	1	8	4
<i>Klebsiella</i> sp PG4-2	97	AB277851	4	1	6	5	5	0	2	0
<i>Photobacterium damsela</i> subsp <i>piscicida</i> pRDA19	98	AJ749800	8	0	1	0	3	1	3	1
<i>Pseudomonas</i>	99	IQ766121	8	7	2	4	3	3	6	8
<i>Pseudomonas</i> sp FG-12b	99	JF724071	4	4	4	3	5	0	2	0
<i>Pseudomonas</i> sp Iso-13	95	KC768739	0	2	4	0	4	5	3	2
<i>Pseudomonas</i> sp Ant-4	98	HF678977	1	0	5	4	1	0	2	0
<i>Pseudomonas acephalitica</i> Ind01	99	AM407893	0	4	0	1	0	3	0	6
<i>Pseudomonas fluorescens</i> LMG 5329	95	JQ974027	0	2	0	2	3	0	4	0
<i>Shewanella putrefaciens</i> pdp11	98	JX415533	0	7	0	6	0	4	0	3
<i>Shewanella</i> ANA	99	CP00046	0	8	0	4	0	5	0	5
<i>Vibrio</i> sp DMS01	97	FJ463236	0	0	4	1	5	5	0	0
<i>Vibrio campbelli</i> HNS034	99	JN128268	2	2	1	1	5	6	6	6
<i>Vibrio natriegens</i> 01/252	98	AJ874353	1	0	0	0	0	5	0	5
<i>Vibrio parahaemolyticus</i> qdfsVp001	98	JN108879	0	2	0	1	0	1	0	0
<i>Vibrio</i> sp Pelg0901	98	JF330909	0	6	0	6	0	5	0	4
<i>Actinobacteria</i>										
<i>Rhodococcus erythropolis</i> H11	99	EF204435	8	0	6	6	2	2	5	5
<i>Rhodococcus</i> sp TM1	98	AY642534	2	1	7	2	4	0	1	0
Firmicutes										
<i>Anoxybacillus</i> sp D503	97	FJ430046	0	0	2	1	6	3	0	0
Uncultured <i>Anoxybacillus</i> sp K.b-8	97	HM031453	2	0	2	2	4	5	5	2
<i>Brevibacillus paravebris</i> DYJK58	98	JX415533	4	6	4	2	3	2	2	6
<i>Candidatus</i> Arthromitus sp SFB-rat-Yit	99	NR074540	0	0	2	2	0	4	0	2
<i>Candidatus</i> Arthromitus sp SFB-rat-Yit	99	NR074545	5	0	2	2	0	4	0	2
<i>Candidatus</i> Arthromitus	98	D86303	0	0	0	0	0	2	0	1
<i>Geobacillus</i> sp V1W70BlkII	98	FN556447	3	3	6	3	4	0	4	0
<i>Lactobacillus helveticus</i> GIMC23:KSN	98	JF728275	0	5	0	5	0	2	0	1
<i>Mollicutes</i>										
<i>Mycoplasma microti</i> IL371	98	FJ609188	4	6	4	2	0	0	0	2
Uncultured <i>Mycoplasma</i> sp Kb.1	99	HM031446	4	0	3	3	1	1	2	9
Unidentified microorganisms										
Marine bacterium B37	96	AB607159	8	7	2	4	3	3	6	8
Bacterium A119	98	HQ332151	3	4	1	5	4	1	4	2
Bacterium PJ-35	95	KF146331	0	1	0	2	3	5	6	0
Uncultured bacterium R4J7L4_B3	95	GQ467872	0	0	0	2	3	0	4	0
Uncultured bacterium ncd89b06c1	98	HM256348	0	0	1	4	3	3	3	1
Uncultured bacterium BR01AD06	98	DQ857141	0	0	0	0	0	4	0	1

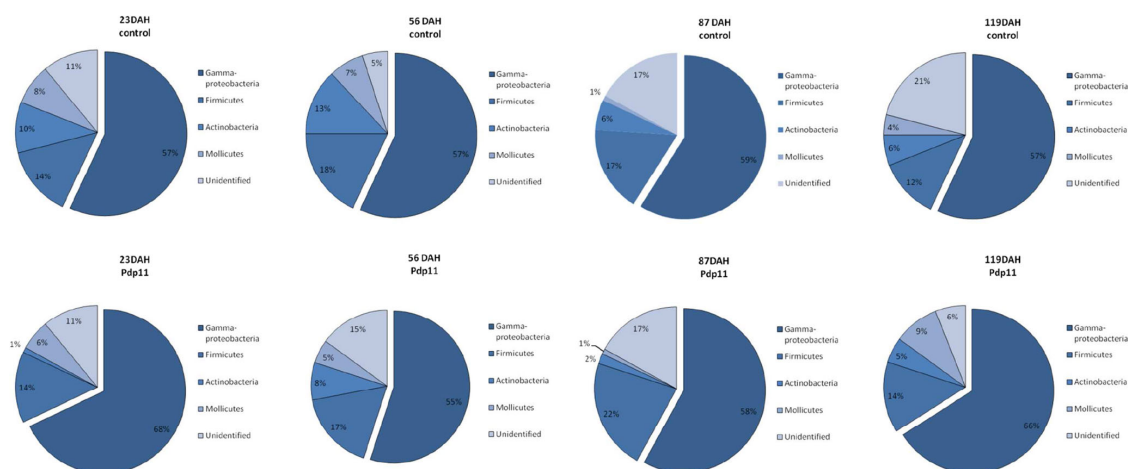


Fig. 3 Relative abundance of bacterial groups detected in the intestines of sole specimens fed control (control) and *Shewanella putrefaciens* Pdp11 supplemented (Pdp11) diets from 10 to 30 days after hatching (DAH). Samples were obtained from intestines at 23 DAH (a), 56 DAH

(b), 87 DAH (c), and 119 DAH (d). Percentages were calculated relative to the total number of clones obtained for each treatment and fish developmental stage

Fig. 4 Sequencing of clones obtained from intestinal microbiota of larvae fed control and probiotic diets along the stages sampled

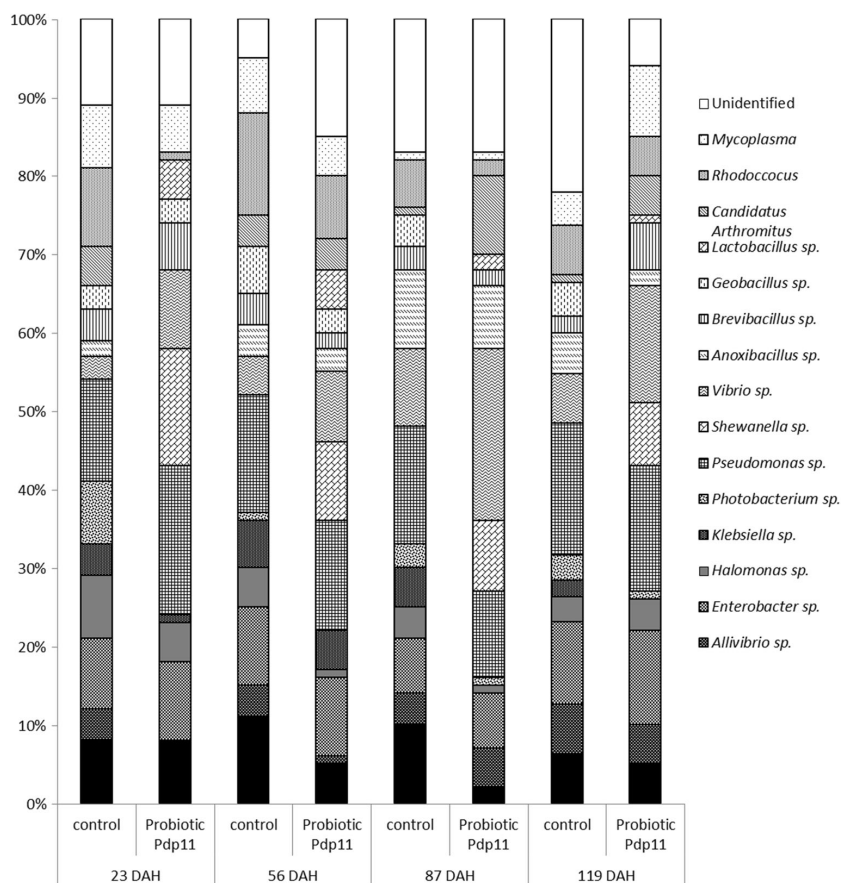


Table 3 SIMPER analysis performed to identify contribution of bacterial groups to total dissimilarity between control and probiotic-fed *Solea senegalensis* larvae. Values correspond to dissimilarity percentages

between probiotic and control groups. A total of 100 cloned sequences were identified for each treatment and fish developmental stage

Group	Dissimilarity percentage (%)			
	23 DAH	56 DAH	89 DAH	119 DAH
<i>Acinetobacter</i>	0	<i>10.34</i>	<i>12.12</i>	1.58
<i>Alliivibrio</i>	5.55	5.17	1.51	1.58
<i>Enterobacter</i>	1.38	0	0	3.17
<i>Halomonas</i>	4.16	<i>6.89</i>	4.54	1.58
<i>Klebsiella</i>	4.16	1.72	7.57	3.17
<i>Photobacterium damsela</i> subsp. <i>piscicida</i>	<i>11.11</i>	1.72	3.03	3.17
<i>Pseudomonas</i>	8.33	1.72	6.06	0
<i>Shewanella</i>	<i>20.83</i>	<i>17.24</i>	<i>13.64</i>	12.7
<i>Vibrio</i>	<i>9.77</i>	<i>6.89</i>	<i>18.18</i>	<i>14.29</i>
<i>Anoxybacillus</i>	2.77	1.72	3.03	4.76
<i>Brevibacillus</i>	2.77	3.44	1.51	6.34
<i>Geobacillus</i>	0	5.17	6.06	6.34
<i>Lactobacillus</i>	6.94	8.62	3.03	1.58
<i>Candidatus</i> Arthromitus	6.94	0	<i>13.64</i>	6.34
<i>Rhodococcus</i>	<i>12.5</i>	<i>8.62</i>	6.06	1.58
<i>Mycoplasma</i>	2.77	3.44	0	7.93
Unidentified	0	<i>17.24</i>	0	<i>23nn81</i>

Values in italics represent percentages contributing to 50 % dissimilarity in each group

A core of six OTUs consisting in *Pseudomonas acephalitica*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Lactobacillus helveticus*, and *Shewanella* genus, including *Shewanella putrefaciens* Pdp11, was detected in sole specimens. Thus, this core may be considered as a result of the microbiota modulation exerted by *Shewanella putrefaciens* Pdp11. Probiotic modulation was specially marked at 23 DAH when the percentage of probiotic clones was the highest. In this context, clones related to *Mycoplasma*, *Anoxybacillus*, *Alliivibrio* and *Rhodococcus* genera, *Candidatus* Arthromitus, and *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* were not detected as predominant taxa in the intestinal microbiota of 23 DAH *Shewanella putrefaciens* Pdp11 larvae, whereas they were detected in the intestinal microbiota of control larvae, it thus being the dominant taxa. The last two microorganisms have also been detected in the intestinal microbiota of other farmed fish (Cecchini et al. 2012; de Paula Silva et al. 2011). Whereas *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* is an important pathogen for *Solea senegalensis* (Arijo et al. 2005; Zarza and Padrós 2008), *Candidatus* Arthromitus has been suggested as the aetiological agent of gastroenteritis syndrome in rainbow trout (Urdaci et al. 2001).

It is worthy to highlight the absence or lower presence of *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* in the intestinal microbiota of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 larvae in parallel with increased presence of the probiotic strain. According

to Magnadóttir (2010), live probiotic bacteria can affect the intestinal microbiota by their antagonistic activity and/or competition for nutrients and space, reducing the number of pathogenic bacteria. In the present study, *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida* absence could be related to *Shewanella putrefaciens* Pdp11 ability to inhibit growth and adhesion of this pathogen to the sole intestinal mucus, as Chabrillon et al. 2005a demonstrated in in vitro studies. Although other components cannot be ruled out, adhesion interference could explain the higher resistance against this pathogen reported in sole juveniles fed a diet supplemented with *Shewanella putrefaciens* Pdp11 (Díaz-Rosales et al. 2009; García de la Banda et al. 2010, 2012).

On the other hand, high proteolytic activity levels have been reported in *Lactobacillus helveticus* (Beganovic et al. 2013), as well as different probiotic abilities such as immunomodulation by bioactive peptides released during fermentation (Taverniti et al. 2013; Vinderola et al. 2007), enhancement of goblet cell/colonocyte ratio, the recovery of mucosal atrophy induced by malnutrition (Dock-Nascimento et al. 2007), and antibacterial effect against pathogens mediated by its surface-layer protein and by competitive exclusion (Ahire et al. 2013; Beganović et al. 2011). *Shewanella* genus has been reported as the predominant bacterial taxa in *Solea senegalensis* specimens fed natural prey (Martín-Antonio et al. 2007) and commercial diet (Tapia-Paniagua et al.

2010). *Shewanella* has also been detected in the intestinal microbiota of other fish species such as rainbow trout (Navarrete et al. 2010), goldfish (*Carassius auratus*) (de Paula Silva et al. 2011), and halibut (*Hippoglossus hippoglossus* L.) (Bjornsdottir et al. 2009). In the present study *Shewanella putrefaciens* Pdp11 was cloned and sequenced from 23 to 119 DAH samples as predominant clone from probiotic larvae and fry, thus supporting the ability to colonize reported in previous studies (Lobo et al. 2014; Tapia-Paniagua et al. 2010). The administration of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 also resulted in increased numbers of clones corresponding to *Vibrio* genus, especially those identified as *V. parahaemolyticus*. *Vibrio* species have frequently been isolated from seawater and the surface of healthy fish in aquaculture systems (Montes et al. 2006; Chackraborty and Surendran 2009). Although virulent strains of *Vibrio* can produce several diseases in aquaculture organisms such as prawn (Khuntia et al. 2008), turbot *Scophthalmus maximus* (Villamil et al. 2003b), and Senegalese sole (Zorrilla et al. 2003), their presence in intestinal microbiota of *Solea senegalensis* larvae should not always be considered as health risk. In this way, survival rates of control and *Shewanella putrefaciens* Pdp11 groups observed in this study were similar at 119 DAH (88.05–89.83 %) (Lobo et al. 2014, personal communication).

In short, this study demonstrates the colonization capability of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 and its ability to modulate the predominant bacterial groups of the intestinal microbiota of Senegalese sole larvae. A short pulse (10–30 DAH) of *Shewanella putrefaciens* Pdp11 feeding results in increased levels of *Vibrio* genus and decreased the presence of the fish pathogen *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. This modulation may constitute an effective tool in a suitable *Solea senegalensis* larviculture performance.

Acknowledgments The authors received the financial support from the Ministerio Español de Ciencia y Tecnología (AGL2011-30381-C03-02). S. Tapia-Paniagua wishes to thank the Ministerio Español de Educación y Ciencia for a F.P.U. scholarship.

References

- Ahire JJ, Mokalhe NU, Patil HJ, Chaudhari BL (2013) Antioxidative potential of folate producing probiotic *Lactobacillus helveticus* CD6. *J Food Sci Technol MYSORE* 50:26–34
- Arijo S, Chabrillón M, Díaz-Rosales P, Rico RM, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Toranzo AE, Moriño MA (2005) Bacteria isolated from outbreaks affecting cultured sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *Bull Eur Assoc Fish Pathol* 25:148–154
- Askarian F, Kousha A, Salma W, Ringø E (2011) The effect of lactic acid bacteria administration on growth, digestive enzyme activity and gut microbiota in Persian sturgeon (*Acipenser persicus*) and beluga (*Huso huso*) fry. *Aquacult Nutr* 17:488–497
- Askarian F, Zhou Z, Olsen RE, Sperstad S, Ringø E (2012) Culturable autochthonous bacteria in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.) fed diets with or without chitin. Characterization by 16S rRNA gene sequencing, ability to produce enzymes and in vitro growth inhibition of four fish pathogens. *Aquaculture* 326–329:1–8
- Avella MA, Gioacchini G, Decamp O, Makridis P, Bracciatelli C, Carnevali O (2010) Application of multi-species of *Bacillus* in sea bream larviculture. *Aquaculture* 305:12–19
- Avella MA, Olivotto I, Silvi S, Ribeco C, Cresci A, Palermo F, Polzonetti A, Carnevali O (2011) Use of *Enterococcus faecium* to improve common sole (*Solea solea*) larviculture. *Aquaculture* 315:384–393
- Beganović J, Frece J, Kos B, Pavunc AL, Habjanić K, Šušković J (2011) Functionality of the S-layer protein from the probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anton Leeuw J Microbiol* 100:43–53
- Beganović J, Kos B, Pavunc AL, Uroic K, Dzidara P, Suskovic J (2013) Proteolytic activity of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92. *Anaerobic* 20:58–64
- Bjornsdottir R, Johannsdottir J, Coe J, Smaradottir H, Agustsson T, Sigurgisladottir G (2009) Survival and quality of halibut larvae (*Hippoglossus hippoglossus* L.) in intensive farming: possible impact of the intestinal bacterial community. *Aquaculture* 286:53–63
- Cañavate JP, Fernández-Díaz C (1999) Influence of co-feeding larvae with live and inert diets on weaning the sole *Solea senegalensis* onto commercial dry feeds. *Aquaculture* 174:255–263
- Carnevali O, Zamponi MC, Sulpizio R, Rollo A, Nardi M, Orpiano C, Silvi S, Caggiano M, Polzonetti AM, Cresci A (2004) Administration of probiotic strain to improve sea bream wellness during development. *Aquacult Int* 12:377–386
- Carnevali O, de Vivo L, Sulpizio R, Gioacchini G, Olivotto I, Silvi S, Cresci A (2006) Growth improvement by probiotic in European sea bass juveniles (*Dicentrarchus labrax*, L.) with particular attention to IGF-1, myostatin and cortisol gene expression. *Aquaculture* 258:430–438
- Cecchini F, Iacumin L, Fontanot M, Comi G, Manzano M (2012) Identification of the unculturable bacteria *Candidatus arthromitus* in the intestinal content of trouts using Dot blot and Southern blot techniques. *Vet Microbiol* 156:389–394
- Chabrillón M, Rico S, Balebona MC, Moriño MA (2005a) Adhesion to sole, *Solea senegalensis* Kaup, mucus of microorganisms isolated from farmed fish, and their interaction with *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. *J Fish Dis* 28:229–237
- Chabrillón M, Rico RM, Arijo S, Díaz-Rosales P, Balebona MC, Moriño MA (2005b) Interactions of microorganisms isolated from gilthead seabream, *Sparus aurata* L., on *Vibrio harveyi*, a pathogen of farmed Senegalese sole, *Solea senegalensis* (Kaup). *J Fish Dis* 28:531–537
- Chackraborty RD, Surendran PK (2009) incidence and molecular typing of *Vibrio parahaemolyticus* from tiger shrimp culture environments along the Southwest coast of India. *Food Biotechnol* 23:284–311
- Chen Q, Yan Q, Wang K, Zhuang Z, Wang X (2008) Portal of entry for pathogenic *Vibrio alginolyticus* into large yellow croaker *Pseudosciaena crocea*, and characteristics of bacterial adhesion to mucus. *Dis Aquat Org* 80:181–188
- Conceicao LEC, Ribeiro L, Engrola S, Aragao C, Morais S, Lacuisse M, Soares F, Dinis MT (2007) Nutritional physiology during development of Senegalese sole (*Solea senegalensis*). *Aquaculture* 268:64–81
- Dámaso-Rodrigues ML, Pousão-Ferreira P, Ribeiro L, Coutinho J, Bandarra NM, Gavaia PJ, Narciso L, Morais S (2010) Lack of essential fatty acids in live feed during larval and post-larval rearing: effect on the performance of juvenile *Solea senegalensis*. *Aquacult Int* 18:741–757
- De Paula Silva FC, Nicoli JR, Zambonino-Infante JL, Kaushik S, Gatesoupe FJ (2011) Influence of the diet on the microbial diversity of faecal and gastrointestinal contents in gilthead seabream (*Sparus*

- aurata*) and intestinal contents in goldfish (*Carassius auratus*). FEMS Microbiol Ecol 78:285–296
- De Schryver P, Sinha AK, Kunwar PS, Baruah K, Verstraete W, Boon N, Gudrun De Boeck G, Bossier P (2010) Poly- β hydroxybutyrate (PHB) increases growth performance and intestinal bacterial range-weighted richness in juvenile European sea bass, *Dicentrarchus labrax*. Appl Microbiol Biotechnol 186:1535–1541
- Dias DC, Correa CF, Leonardo AFG, Tachibana L, Romagosa E, Ranzani-Paiva MJT (2011) Probiótico na larvicultura de matrinxã, *Brycon amazonicus*. Acta Sci 33:365–368
- Díaz-Rosales P, Arijó S, Chabrilón M, Alarcón FJ, Tapia-Paniagua ST, Martínez-Manzanares E, Balebona MC, Moriño MA (2009) Effects of two closely related probiotics on respiratory burst activity of Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup) phagocytes, and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquaculture 293:16–21
- Dock-Nascimento DB, Junqueira K, Aguilar-Nascimento JE (2007) Rapid restoration of colonic goblet cells induced by a hydrolyzed diet containing probiotics in experimental malnutrition. Acta Cir Bras 22:72–76
- Engrola S, Figueira L, Conceição LEC, Gavaia PJ, Ribeiro L, Dinis MT (2009) Co-feeding in Senegalese sole larvae with inert diet from mouth opening promotes growth at weaning. Aquaculture 288:264–272
- Ferguson RMW, Merrifield DL, Harper GM, Rawling MD, Mustafa S, Picchietti S, Balcázar JL, Davies SJ (2010) The effect of *Pediococcus acidilactici* on the gut microbiota and immune status of on-growing red tilapia (*Oreochromis niloticus*). J Appl Microbiol 109:851–862
- García de la Banda I, Lobo C, León-Rubio JM, Tapia-Paniagua ST, Balebona MC, Moriño MA, Moreno-Ventas X, Lucas LM, Linares F, Arce F, Arijó S (2010) Influence of two closely related probiotics on juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858) performance and protection against *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquaculture 306:281–288
- García de la Banda I, Lobo C, Chabrilón M, León-Rubio JM, Arijó S, Pazos G, Lucas LM, Moriño MA (2012) Influence of dietary administration of a probiotic on Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup, 1858) on growth, body composition and resistance to *Photobacterium damsela* subsp. *piscicida*. Aquac Res 43(5):662–669
- Gatesoupe FJ (2008) Updating the importance of lactic acid bacteria in fish farming: natural occurrence and probiotic treatments. J Mol Microbiol Biotechnol 14:107–114
- Gray JP, Herwig RP (1996) Phylogenetic analysis of the bacterial communities in marine sediments. Appl Environ Microbiol 62:4049–4059
- Hansen GH, Olafsen JA (1999) Bacterial interactions in early life stages of marine cold water fish. Microb Ecol 38:1–26
- Hernández-Martínez M, Castro-Barrera T, Garduño-Dionate M, Castro-Mejía G, Baltierra-Rodríguez JL (2009) Efecto del alimento vivo enriquecido con *Lactobacillus casei* en la sobrevivencia y crecimiento de larvas y juveniles de *Chirostoma estor* (Pisces: Atherinopsidae). Cienc Pesq 17:5–12
- Hicks RE, Amann RI, Stahl DA (1992) Dual staining of natural bacterioplankton with 4'6-diamidino-2-phenylindole and fluorescent oligonucleotide probes targeting kingdom-level 16S rRNA sequences. Appl Environ Microbiol 58:2158–2163
- Høj L, Bourne DG, Hall MR (2009) Localization, abundance and community structure of bacteria associated with *Artemia*: effects of nauplii enrichment and antimicrobial treatment. Aquaculture 293: 278–285
- Ingerslev H-C, von Gersdorff Jorgensen L, Lenz-Strube M, Larsen N, Dalsgaard I, Boyne M, Madsen L (2014) The development of the gut microbiota in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is affected by first feeding and diet type. Aquaculture 424–425:24–34
- Kane MD, Poulsen LK, Stahl DA (1993) Monitoring the enrichment and isolation of sulfate-reducing bacteria by using oligonucleotide hybridization probes designed from environmentally derived 16S rRNA sequences. Appl Environ Microbiol 59:682–686
- Khuntia C, Das B, Samantaray BR, Samal SK, Mishra B (2008) Characterization and pathogenicity studies of *Vibrio parahaemolyticus* isolated from diseased freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man). Aquac Res 39:301–310
- Kumar NR, Raman RP, Jadhao SB, Brahmchari RK, Kumar K, Dash G (2013) Effect of dietary supplementation of *Bacillus licheniformis* on gut microbiota, growth and immune response in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* (de Man, 1879). Aquacult Int 21: 387–403
- Lobo C, Moreno-Ventas X, Tapia-Paniagua ST, Rodríguez C, Moriño MA, García de la Banda I (2014) Dietary probiotic supplementation (*Shewanella putrefaciens* Pdp11) modulates gut microbiota and promotes growth and condition in Senegalese sole larviculture. Fish Physiol Biochem 40:295–309
- Lund I, Steenfeldt SJ, Hansen BW (2007) Effect of dietary arachidonic acid, eicosapentaenoic acid and docosahexaenoic acid on survival, growth and pigmentation in larvae of common sole (*Solea solea* L.). Aquaculture 273:532–544
- Magnadottir B (2010) Immunological control of fish diseases. Mar Biotechnol 12:361–379
- Mai M, Engrola S, Morais S, Portella MC, Verani JR, Dinis MT, Conceição L (2009) Co-feeding of live feed and inert diet from first-feeding affects *Artemia* lipid digestibility and retention in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) larvae. Aquaculture 296: 284–291
- Martín-Antonio B, Manchado M, Infante C, Zerolo R, Labella A, Alonso MC, Borrego JJ (2007) Intestinal microbiota variation in Senegalese sole (*Solea senegalensis*) under different feeding regimes. Aquac Res 38:1213–1222
- Martínez G, Shaw EM, Carrillo M, Zanuy S (1998) Protein salting-out method applied to genomic DNA isolation from fish whole blood. Biotechniques 24:138–139
- Marzorati M, Wittebolle L, Boon N, Daffonchio D, Verstraete W (2008) How to get more out of molecular fingerprints: practical tools for microbial ecology. Environ Microbiol 10:1571–1581
- Merrifield DL, Dimitroglou A, Foey A, Davies SJ, Baker RTM, Børgwald J, Castex M, Ringo E (2010) The current status and future focus of probiotic and prebiotic applications for salmonids. Aquaculture 302: 1–18
- Montes M, Farto R, Pérez MJ, Armada S, Nieto T (2006) Genotypic diversity of *Vibrio* isolates associated with turbot (*Scophthalmus maximus*) culture. Res Microbiol 157:487–495
- Muyzer G, de Waal EC, Uitterlinden AG (1993) Profiling of complex microbial populations by denaturing gradient gel electrophoresis analysis of polymerase chain reaction amplified genes for 16S rRNA. Appl Environ Microbiol 59:695–700
- Navarrete P, Magne F, Mardones P, Riveros M, Opazo R, Suau A, Pochart P, Romero J (2010) Molecular analysis of intestinal microbiota of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). FEMS Microbiol Ecol 71: 148–156
- Parra G, Yúfera M (1999) Tolerance response to ammonia and nitrite exposure in larvae of two marine fish species (gilthead seabream *Sparus aurata* L. and Senegal sole *Solea senegalensis* Kaup). Aquac Res 30:857–863
- Picchietti S, Mazzini M, Taddei AR, Renna R, Fausto AM, Mulero V, Carnevali O, Cresci A, Abelli L (2007) Effects of administration of probiotic strains on GALT of larval gilthead seabream: immunohistochemical and ultrastructural studies. Fish Shellfish Immunol 22: 57–67
- Ramírez RF, Dixon BA (2003) Enzyme production by obligate intestinal anaerobic bacteria isolated from Oscars (*Astronotus ocellatus*),

- angelfish (*Pterophyllum scalare*) and southern flounder (*Paralichthys lethostigma*). *Aquaculture* 227:417–426
- Ringø E, Jutfelt F, Kanapathippillai P, Bakken Y, Sundell K, Glette J, Mayhew TM, Myklebust R, Olsen RE (2004) Damaging effect of the fish pathogen *Aeromonas salmonicida* ssp. *salmonicida* on intestinal enterocytes of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Cell Tissue Res* 318:305–311
- Ringø E, Myklebust R, Mayhew TM, Olsen RE (2007) Bacterial translocation and pathogenesis in the digestive tract of larvae and fry. *Aquaculture* 268:251–264
- Rodríguez C, Lorenzo A, Martín V (2009) Nutrición lipídica. In: OESA, CSIC, MARM (Eds) *La nutrición y la alimentación en piscicultura*, Madrid
- Rombout JHWM, Abelli L, Picchiatti S, Scapigliati G, Kiron V (2011) Teleost intestinal immunology. *Fish Shellfish Immunol* 31:616–626
- Sáenz de Rodríguez MA, Díaz-Rosales P, Chabrállón M, Smidt H, Arijó S, León-Rubio JM, Alarcón FJ, Balebona MC, Moriño MA, Cara JB, Moyano FJ (2009) Effect of dietary administration of probiotics on growth and intestine functionality of juvenile Senegalese sole (*Solea senegalensis*, Kaup 1858). *Aquacult Nutr* 15:177–185
- Sanguinetti CJ, Dias-Neto E, Simpson AJG (1994) Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels. *BioTechniques* 17:915–919
- Sekirov I, Finlay BB (2009) The role of the intestinal microbiota in enteric infection. *J Physiol* 587:4159–4167
- Sugita H, Nakamura T, Tanaka K, Deguchi Y (1994) Identification of *Aeromonas* species isolated from freshwater fish with the microplate hybridization method. *Appl Environ Microbiol* 60:3036–3038
- Sun YZ, Yang HL, Huang KP, Ye JD, Zhang CX (2013) Application of autochthonous *Bacillus* bioencapsulated in copepod to grouper *Epinephelus coioides* larvae. *Aquaculture* 392:44–50
- Tanu DDD, Khandeparker R, Sreepada RA, Sanaye SV, Pawar HB (2012) A study on bacteria associated with the intestinal tract of farmed yellow seahorse, *Hippocampus kuda* (Bleeker, 1852): characterization and extracellular enzymes. *Aquac Res* 43:386–394
- Tapia-Paniagua ST, Chabrállón M, Díaz-Rosales P, García de la Banda I, Lobo C, Balebona MC, Moriño MA (2010) Intestinal microbiota diversity of the flat fish *Solea senegalensis* (Kaup, 1858) following probiotic administration. *Microbiol Ecol* 60:310–319
- Taverniti V, Stuknyte M, Minuzzo M, Arioli S, de Noni I, Scabiosi C, Cordova ZM, Junttila I, Hamalainen S, Turpeinen H, Mora D, Karp M, Pesu M, Guglielmetti S (2013) S-Layer protein mediates the stimulatory effect of *Lactobacillus helveticus* MIMLh5 on innate immunity. *Appl Environ Microbiol* 79:1221–1231
- Tinh NTN, Dierckens K, Sorgeloos P, Bossier P (2008) A review of the functionality of probiotics in the larviculture food chain. *Mar Biotechnol* 10:1–12
- Tkavc R, Gostinčar C, Turk M, Pieter T, Visscher PT, Oren A, Gunde-Cimerman N (2011) Bacterial communities in the 'petola' microbial mat from the Sečovlje salterns (Slovenia). *FEMS Microbiol Ecol* 75: 48–62
- Urdaci MC, Regnault B, Grimont PAD (2001) Identification by in situ hybridization of segmented filamentous bacteria in the intestine of diarthric rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Res Microb* 152: 67–73
- Van der Gast CJ, Jefferson B, Reid E, Robinson T, Bailey MJ, Judd SJ, Thompson IP (2006) Bacterial diversity is determined by volume in membrane bioreactors. *Environ Microbiol* 8:1048–1055
- Villamil L, Figueras A, Planas M, Novoa B (2003a) Control of *Vibrio alginolyticus* in *Artemia* culture by treatment with bacterial probiotics. *Aquaculture* 219:43–56
- Villamil L, Figueras A, Toranzo AE, Planas M, Novoa B (2003b) Isolation of a highly pathogenic *Vibrio pelagius* strain associated with mass mortalities of turbot, *Scophthalmus maximus* (L.), larvae. *J Fish Dis* 26:293–303
- Vinderola G, Matar C, Palacios J, Perdigon G (2007) Mucosal immunomodulation by the non-bacterial fraction of milk fermented by *Lactobacillus helveticus*. *Int J Food Microbiol* 115:180–186
- Woodcock CE, Collins JB, Jakabhazy VD, Li XW, Macomber SA, Wu YC (1997) Inversion of the Li-Strahler canopy reflectance model for mapping forest structure. *IEEE Trans Geosci Remote Sens* 35:405–414
- Yang HL, Sun YZ, Ma RL, Ye JD (2012) PCR-DGGE analysis of the autochthonous gut microbiota of grouper *Epinephelus coioides* following probiotic *Bacillus clausii* administration. *Aquacult Res* 43: 489–497
- Zarza C, Padrós F (2008) An overview of diseases of farmed sole. *Abstr IV Internat Sole Work*. Faro, Portugal: 15
- Zorrilla I, Moriño MA, Castro D, Balebona MC, Borrego JJ (2003) Intraspecific characterization of *Vibrio alginolyticus* isolates recovered from cultured fish in Spain. *J Appl Microbiol* 95:1106–1116

